

**OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE QUERATINOCITOS
HUMANOS SEMBRADOS EN SOPORTES DE SUBMUCOSA INTESINAL
PORCINA**

ANGELA XIMENA AMÓRTEGUI RAMÍREZ

**Tesis de grado para optar al título de
Magíster en Ciencias Biomédicas**

Asesora

SANDRA RAMÍREZ CLAVIJO

PhD

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA – DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA
MECÁNICA
UNIVERSIDAD DEL ROSARIO - FACULTAD DE MEDICINA
BOGOTÁ D.C., 2005**

A mi *Madre*, por todo su amor,
dedicación y paciencia.

A mi *Menchis*, por ser siempre el apoyo
incondicional de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo su constante apoyo y comprensión.

A la Dra. Sandra Ramírez por todas sus enseñanzas, su apoyo y confianza.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario, por todos sus aportes, su cooperación y disposición de ayuda constantes.

Al Dr. Juan Carlos Briceño y a la Dra. Helena Groot por su colaboración.

A todo el grupo médico y auxiliar de la Clínica Infantil Colsubsidio por todo el interés prestado, su contribución para la realización de este trabajo y la actitud siempre tan dispuesta de colaboración.

A Constanza Martínez y Diana Marcela Tabima por sus contribuciones y sugerencias.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE FOTOGRAFÍAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.2 GENERALES.....	11
2.3 ESPECÍFICOS	11
3. MARCO TEÓRICO.....	12
3.1 GENERALIDADES DE LA PIEL.....	12
3.1.1 La epidermis	12
3.1.1.1 Estrato basal o germinativo	13
3.1.1.2 Estrato espinoso.....	15
3.1.1.3 Estrato granuloso.....	15
3.1.1.4 Estrato lúcido.....	15
3.1.1.5 Estrato córneo.....	16
3.1.2 La dermis	17
3.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL.....	18
3.2.1 Clases de sustitutos de piel.....	19
3.2.1.1 Injertos epidérmicos	21
3.2.1.2 Injertos dérmicos	21
3.2.1.3 Sustitutos bicapa.....	23
3.3 SUBMUCOSA INTESTINAL PORCINA (SIS).....	23
3.4 CULTIVO DE QUERATINOCITOS.....	25
3.4.1 Técnicas de aislamiento para queratinocitos	27
3.4.2 Medios de cultivo libres de suero para queratinocitos	29
3.4.2.1 Medio de cultivo “Defined keratinocyte - SFM”	31
4. METODOLOGÍA.....	33

4.1	MATERIALES.....	33
4.1.1	Fuente celular	33
4.1.2	Reactivos	33
4.1.3	Instrumentos de laboratorio.....	36
4.2	VARIABLES DE ESTUDIO	37
4.3	PROCEDIMIENTO	38
4.3.1	Medida de la viabilidad celular	38
4.3.2	Protocolo de cultivo.....	39
5.	RESULTADOS	45
6.	ANÀLISIS DE RESULTADOS.....	58
7.	CONCLUSIONES.....	60
	GLOSARIO.....	62
	BIBLIOGRAFÍA.....	64
	ANEXO A. Carta de aprobación para el uso de tejidos - Clínica Colsubsidio.	67
	ANEXO B. Consideraciones logísticas y bioéticas para el uso de los tejidos.	68
	ANEXO C. Formato de consentimiento informado.....	70
	ANEXO D. Càlculos de TC, EFC y curvas de crecimiento.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratos de la epidermis. EB (estrato basal o germinativo), EE (estrato espinoso), EG(estrato granuloso), EC (estrato córneo).....	14
Figura 2. Dermis papilar (DP) y dermis reticular (DR)	18
Figura 3. Sección transversal del intestino delgado (yeyuno).....	24
Figura 4. Esquema del protocolo de aislamiento y cultivo de queratinocitos.....	40
Figura 5. Superficies de cultivo utilizadas.	42
Figura 6. Rejilla de medición de colonias, 4X.	43
Figura 7. Viabilidad celular Vs. Edad del paciente.....	47
Figura 8. Células vivas/ml Vs. Tamaño de la muestra.....	47

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Grupos de células queratinizadas no proliferantes, 10X.....	48
Fotografía 2. Adhesión celular al tercer día de cultivo, 10X.	48
Fotografía 3. Cultivo, días 4-5.	49
Fotografía 4. Formación de colonias, día 6, 20X.....	49
Fotografía 5. Colonias, día 9, 4X	49
Fotografía 6. Monocapa confluyente, día 12, 10X.	50
Fotografía 7. Monocapa confluyente, día 12, 20X.	50
Fotografía 8. Tipos celulares contaminantes, día 10, 10X.....	51
Fotografía 9. Melanocitos contaminantes, día 10.	51
Fotografía 10. Células cultivadas con 10% de SBF, día 10, 10X.	52
Fotografía 11. Focos de diferenciación terminal, día 10.....	53
Fotografía 12. Estratificación, día 18,10X.....	53
Fotografía 13. Coloración de colonias con rodamina, día 12, 10X.	53
Fotografía 14. SIS hidratada, 10X.	55
Fotografía 15. SIS con células, día 3, 10X.....	55
Fotografía 16. Coloración de un cultivo sobre SIS con rodamina, día 9, 20X.	55
Fotografía 17. Tinción de un cultivo sobre SIS con MTT, día 9, 20X.....	56
Fotografía 18. Tinción con MTT, células de cultivo primario, día 9, 10X.....	56
Fotografía 19. Tinción con MTT, células de primer pase, día 12, 10X.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sustitutos de piel	20
Tabla 2. Medios de cultivo libres de suero para queratinocitos	30
Tabla 3. Muestras procesadas para la estandarización de la técnica de cultivo.	45
Tabla 4. TC promedio y EFC resultantes.....	54
Tabla 5. Índices de absorbancia de cultivos sobre submucosa.....	57

1. INTRODUCCIÓN

El avance significativo de la ingeniería de tejidos en el campo de la regeneración de piel, se debe principalmente a las limitaciones asociadas con el uso de auto injertos inmediatos, dado que la creación de un lugar donante en el paciente, constituye un riesgo para el mismo, además de ser insuficiente en muchos de los casos en los que se presentan áreas afectadas de gran extensión.

Para las lesiones con gran pérdida de sustancia y considerable defecto tisular, donde los bordes no pueden ponerse en contacto y no logran cicatrizar de primera intención, el método quirúrgico más común para su tratamiento es el uso de algún tipo de injerto, pero el costo y largos periodos de tiempo para la recuperación pueden constituir factores agravantes.

Asimismo, la baja disponibilidad de sustitutos comerciales debido a sus altos costos, impide en la mayoría de los casos un tratamiento óptimo para la curación de heridas o lesiones significativas en pacientes quemados, ulcerados o con algún tipo de patología que implique pérdida de piel.

La piel presenta dos tipos celulares principales en su estructura: queratinocitos en su capa epidérmica y fibroblastos en su capa dérmica. Del buen manejo in vitro de estos dos componentes celulares, depende el desarrollo de un sustituto que permita imitar adecuadamente el comportamiento o funcionalidad de la piel in vivo. Desde sus inicios, la ingeniería de tejidos ha creado varios tipos de sustitutos que involucran uno o ambos tipos celulares, para lo cual la clase de matriz o soporte empleado para su crecimiento ha sido de particular importancia, puesto que su composición, biocompatibilidad, índice de biodegradación e interacción con los elementos y productos celulares, definen el éxito o el fracaso del sustituto [1].

Se ha comprobado que el empleo de la submucosa del intestino delgado de cerdo, SIS (por la sigla en inglés de *small intestinal submucosa*) como biomaterial de relleno para tratar lesiones, por su especial composición, facilita que la cicatrización ocurra en un menor tiempo y por consiguiente, que se disminuyan los costos del tratamiento. Además, causa menos dolor desde su primera aplicación y disminuye la reacción inflamatoria, permitiendo una movilidad temprana [2]. Matrices de tejido acelular de SIS ya se han utilizado en la regeneración de tejidos como tracto urinario, tendón, ligamento, hueso plano, vasos sanguíneos y tejidos blandos sin evidencia de rechazo inmunológico [1].

Igualmente SIS ha sido utilizada como matriz de sostenimiento para algunos tipos de células en modelos animales, como fibroblastos, condrocitos y células endoteliales principalmente, presentando resultados satisfactorios, para la adhesión y crecimiento de las células [3,4,5,6].

Cualquier esfuerzo realizado en el campo de los substitutos de piel, contribuye al desarrollo de mejores alternativas de tratamiento, y dado que trabajos previos ya han caracterizado el cultivo de fibroblastos sobre SIS en Colombia [3], con este trabajo se implementó una técnica de cultivo de queratinocitos humanos sobre SIS como matriz para su acondicionamiento, aportando una información valiosa para aplicaciones clínicas a futuro.

2. OBJETIVOS

2.2 GENERALES

- Desarrollar una metodología para el aislamiento y cultivo de queratinocitos de fuente humana.
- Evaluar el uso de SIS como matriz de soporte para el cultivo de queratinocitos humanos, con el fin de determinar su eficiencia como biomaterial para la obtención de un modelo de sustituto epidérmico.

2.3 ESPECÍFICOS

- Definir un protocolo para el aislamiento de las células epidérmicas y el cultivo selectivo de los queratinocitos humanos a partir de prepucios infantiles.
- Evaluar la adhesión y proliferación de los queratinocitos, determinando la tasa de crecimiento y la formación de colonias en cultivo.
- Comparar la tasa de crecimiento y la eficiencia formadora de colonias de los queratinocitos cultivados con y sin submucosa.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE LA PIEL

La piel es considerada como el órgano más grande del cuerpo y desempeña varias funciones de diferente índole relacionadas con la termorregulación, la protección, el metabolismo y la sensación. Se encuentra dividida en dos regiones principales, la epidermis y la dermis, cada una de las cuales le otorga un rol distinto al funcionamiento de la piel, formando una masa compacta que descansa sobre una capa subyacente de tejido conectivo más laxo, la hipodermis o tejido celular subcutáneo, que almacena el tejido adiposo rico en lípidos y relaciona la piel con las estructuras más profundas.

3.1.1 La epidermis

La epidermis es la capa externa de la piel y está constituida por un epitelio escamoso que tiene un grosor de 0.4 a 1.5 mm. Es la primera barrera de protección contra la invasión de elementos extraños. Las células dominantes a nivel estructural y funcional de la epidermis son los queratinocitos, que sufren un proceso de queratinización, es decir diferenciación en células aplanadas ricas en queratina y anucleadas en el estrato córneo; aunque también se encuentran los melanocitos productores de la melanina de función cosmética y de protección solar (pigmentación de la piel), las células de Langerhans involucradas en la respuesta inmunológica y las células de Merkel de función mecano-receptora. Hay aproximadamente un melanocito por cada 8 queratinocitos basales.

La epidermis se divide, de acuerdo con la morfología de los queratinocitos, en cinco estratos como se observa en la figura 1: germinativo o basal (EB), espinoso (EE), granuloso (EG), lúcido (no se observa en esta figura) y córneo (EC) a través del cuál

los queratinocitos migran hacia la superficie desprendiéndose, proceso que da lugar a la descamación de la piel. La queratinopoyesis es el proceso mediante el cual el queratinocito se divide en la capa basal, y conforme sube a estratos superiores sufre una serie de cambios estructurales, el más importante de ellos es la formación de queratina, llega a la capa cornea y luego se descama. Este proceso tarda 28 días. Son 14 días desde que se la célula se divide en el estrato basal y asciende a la capa cornea y otros 14 días en la capa cornea hasta que se descama [7].

La epidermis es avascular y su cuidado y mantenimiento se realiza por medio de la difusión de sustancias nutritivas desde el lecho capilar de la dermis.

La epidermis y las partes epiteliales de los anexos epidérmicos (glándulas y folículos pilosos) se desarrollan a partir del ectodermo embrionario.

3.1.1.1 Estrato basal o germinativo

El estrato basal provee las células germinales necesarias para la regeneración de las capas epidérmicas. Estas células germinales están separadas de la dermis mediante una fina capa o lámina basal. Después de cada división mitótica, la nueva célula experimenta la maduración o diferenciación progresiva, durante su migración hacia la superficie. Se compone de una única capa de células cilíndricas cúbicas con núcleos ovales y citoplasma basófilo (receptor de colorantes básicos), de las cuales solo el 10% constituye la población de células madre de queratinocitos, cada una de las cuales al dividirse dará lugar a otra célula madre y a una célula de amplificación transitoria con potencial limitado de crecimiento [8].

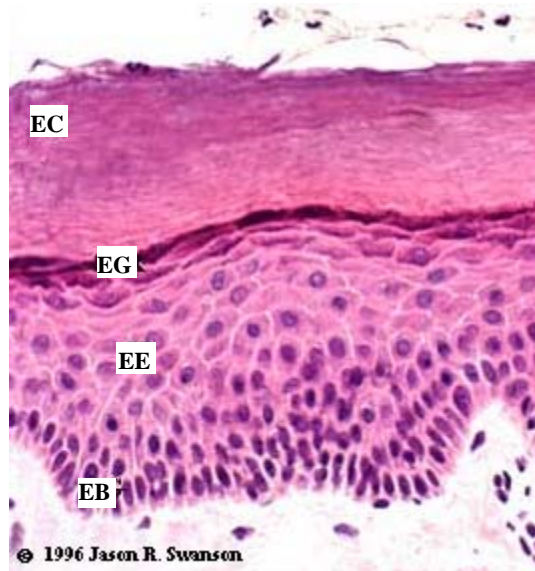


Figura 1. Estratos de la epidermis. EB (estrato basal o germinativo), EE (estrato espinoso), EG(estrato granuloso), EC (estrato cómeo). Adaptado de [27].

La lámina basal constituye una especialización de la matriz extracelular (MEC), que se ubica entre el epitelio y el tejido conjuntivo subyacente. Las moléculas que la forman son sintetizadas en forma conjunta, por las células epiteliales y las conjuntivas. Esencialmente es un retículo laminar de colágeno tipo IV unido a moléculas específicas que le permiten asociarse a las células vecinas y/o a la MEC. Las moléculas asociadas al colágeno corresponden a glicoproteínas (GP) como la laminina y la entactina, y a proteoglicanos (PG) de heparán sulfato llamados perlecanes. La laminina ancla las células epiteliales a la capa densa o superior de la lámina basal, ya que posee sitios de unión para moléculas de integrina de la membrana celular, para colágeno tipo IV y para entactina. La fibronectina une esta lámina densa a las fibrillas colágenas de la capa inferior de la lámina basal. Las funciones principales de la lámina o membrana basal son servir de elemento de anclaje para las células epiteliales y participar en la determinación de la polaridad celular y en la inducción de la diferenciación celular [8,9].

3.1.1.2 Estrato espinoso

Las células que se dividen en el estrato germinativo comienzan a acumular desmosomas (uniones intercelulares) sobre su superficie, lo cual otorga la forma alargada poligonal característica de las células de este estrato. Los núcleos son redondeados y centrales y el citoplasma posee moderada basofilia, con mayor contenido de tonofibrillas o filamentos de queratina que las células basales. Su actividad mitótica es mínima.

3.1.1.3 Estrato granuloso

Se compone de 3 a 5 capas de células aplanadas, con el eje longitudinal paralelo a la superficie de la piel. Como la maduración progresiva de un queratinocito se caracteriza por la acumulación de queratina, las células en este estrato acumulan gránulos de queratohialina basofílicos, que contienen lípidos que se extienden con las conexiones desmosómicas, formando una barrera impermeable que ayuda a prevenir la pérdida de los fluidos corporales. Aquí comienza la cornificación paulatina.

3.1.1.4 Estrato lúcido

El estrato lúcido solamente se observa como una zona delgada en la epidermis gruesa y representa la transición del estrato granuloso al estrato corneo. La epidermis varía en grosor dependiendo de las fuerzas de fricción ejercidas, siendo más gruesa en las palmas de las manos y plantas de los pies. Este estrato está compuesto por escasas capas de células aplanadas densamente empaquetadas. Los núcleos comienzan a degenerar en las células externas del estrato granuloso y desaparecen en el estrato lúcido, donde el contorno del núcleo solo se distingue en células aisladas.

3.1.1.5 Estrato córneo

Se compone de numerosas capas de células planas (15-20) totalmente queratinizadas anucleadas o córneas. En general se distingue una masa gruesa de láminas onduladas, en cuya superficie tiene lugar una continua descamación de células córneas que están separadas entre sí [7,8].

En general, existen 3 tipos de queratinocitos en la epidermis, clasificados de acuerdo con su crecimiento, comportamiento cinético y distribución local:

- Células madre, que se encuentran adheridas a la lámina basal, se auto regeneran y también dan origen a una progenie diferenciada.
- Células de amplificación transitoria, que corresponden al 40% de las células de la capa basal, y que normalmente se diferencian; se desprenden de la membrana o lámina basal y migran hacia la superficie de la epidermis formando múltiples capas cohesivas de queratinocitos, que se diferencian en uno o más tipos de células especializadas.
- Queratinocitos terminalmente diferenciados, sin núcleo, que mueren formando capas externas de células cornificadas.

La epidermis dedica una gran parte de su capacidad de síntesis proteica a la síntesis de queratinas. Las células basales de la epidermis expresan en forma mayoritaria las queratinas K5 y K14 y uno de los primeros cambios asociados al proceso de diferenciación y migración al estrato espinoso, es la inducción de las queratinas K1 y K10, que reemplazan a K5 y K14, y constituyen las proteínas mayoritarias de las capas suprabasales de la epidermis[9].

3.1.2 La dermis

La dermis es la gruesa capa de 1 a 3 mm de grosor y de tejido conectivo en la que se insertan los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas. Además de realizar una función importante de termorregulación, soporta la red vascular que también nutre la epidermis.

Contiene la mayoría de fibroblastos responsables de la secreción de colágeno, elastina y sustancia fundamental que le otorgan a la piel su fortaleza mecánica y elasticidad. También presenta células inmunes para la defensa contra los invasores que atraviesan la epidermis y aunque las células que se encuentran con mayor frecuencia sean los fibroblastos y macrófagos, también hay gran cantidad de mastocitos productores de histamina durante los procesos alérgicos [8].

Además de las proteínas fibrosas estructurales (colágeno y elastina), el tejido conectivo de la dermis contiene la sustancia intercelular fundamental o amorfa constituida por PG que son cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) unidos a una proteína núcleo o GP; siendo el ácido hialurónico el más simple de los GAG. Otros son el condroitín sulfato, el heparán sulfato y el dermatàn sulfato.

La dermis se divide en dos zonas, una papilar y una reticular (figura 2). La dermis papilar se compone de tejido conectivo bastante laxo con gran cantidad de células y un reticulado laxo de fibras de colágeno delgadas (sobre todo colágeno tipo III). Contiene la red vascular que nutre la epidermis avascular y regula la temperatura mediante el incremento o decremento del flujo sanguíneo para la conservación o disipación del calor respectivamente. La dermis papilar también contiene terminales nerviosas sensitivas y corpúsculos de Meissner, estructuras dispuestas en áreas altamente sensitiva.

La capa reticular está constituida por un tejido conectivo denso irregular, que difiere del tejido conectivo laxo de la dermis papilar (notar la diferencia en el número de células, figura 2). Posee gruesas fibras de colágeno (sobre todo colágeno tipo I) dispuestas en grandes haces y abundantes fibras elásticas que forman un reticulado entre los haces de colágeno. La capa reticular es la que otorga a la piel su resistencia y elasticidad, además de alojar otras estructuras derivadas del epitelio como las glándulas y folículos pilosos.

La dermis y las partes dérmicas de los anexos de la piel son mesodérmicas, dado que se originan a partir del mesénquima embrionario [7,9].

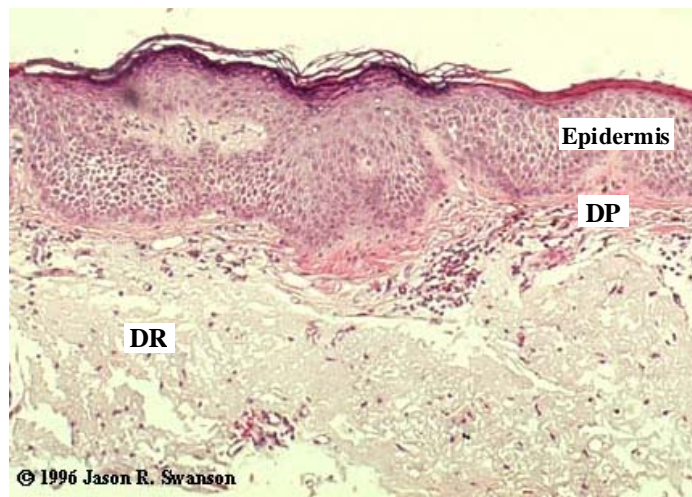


Figura 2. Dermis papilar (DP) y dermis reticular (DR). Adaptado de [27].

3.2 INGENIERÍA DE TEJIDOS DE LA PIEL

Siendo la piel el órgano más grande del organismo, fue uno de los primeros en desarrollarse utilizando técnicas de ingeniería tisular. Inicialmente se usaron células autólogas (propias del individuo) para el reemplazo de piel, cultivando queratinocitos

tomados de una pequeña biopsia de una zona no lesionada para lograr su expansión in vitro y posteriormente su injerto en la zona afectada del paciente. Simultáneamente, otros investigadores emplearon biopolímeros como vehículos para implantar estas células [10].

En 1975, *Rheinwald & Green* describieron un método para el cultivo seriado de queratinocitos humanos sobre una capa de fibroblastos de ratón 3T3 irradiados [11]. Desde entonces esta y otras técnicas para queratinocitos se han desarrollado y perfeccionado ampliamente, ofreciendo la oportunidad de realizar diversas investigaciones tanto in vivo como in vitro.

En 1981 se diseñó una dermis artificial creada con componentes básicos de MEC, como colágeno y GAG, cubiertos por una membrana protectora de silicona. Este tipo de sistema que inicialmente fue acelular, favoreció la migración celular y su consecuente vascularización [12].

Otro sistema ideado para la regeneración de piel consiste en realizar un doble cultivo conformado por células dérmicas y epidérmicas sembradas en una matriz de colágeno; y técnicamente la mayoría de los reemplazos celulares diseñados, ya sea con matrices naturales de colágeno o sintéticas de polímeros biodegradables, han sido fabricados con células alogénicas o procedentes de otro individuo [12,13].

3.2.1 Clases de sustitutos de piel

En la fabricación de piel humana artificial para la reparación de heridas, actualmente existen varios productos de reemplazo, epidérmicos, dérmicos o tipo bicapa, disponibles a escala comercial y otros que se encuentran en desarrollo. La tabla 1 muestra los más importantes, enfatizando sus ventajas, desventajas y costo aproximado [1].

DENOMINACIÓN (nombre comercial)	COSTO (euros/cm²)	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Autoinjerto epidérmico cultivado (Epicel).	20	Cubrimiento permanente. Áreas extensas.	Requiere 3 semanas para el cultivo. Costoso e inestable sin sustituto dérmico.
Aloinjerto epidérmico cultivado.	--	Disponibilidad inmediata. No se requiere biopsia.	Posible transmisión de enfermedades. No es comercial.
Matriz dérmica acelular de cadáver (Alloderm).	10	Disponibilidad inmediata. Inmunológicamente inerte. Prepara la lesión para un injerto posterior.	Riesgo de transmisión de infecciones.
Matriz extracelular de colágeno y condroitín-6-sulfato con cubrimiento de silicona (Integra).	5	Disponibilidad inmediata. La matriz genera neodermis.	Costosa. Necesita entrenamiento para ser colocada. Puede acumular fluido.
Substituto de piel cultivado. Matriz dérmica de colágeno y GAG con fibroblastos y queratinocitos autólogos.	--	Se encuentra en investigación [3].	Requiere 3-4 semanas para el cultivo. No disponible a escala comercial.
Matriz sintética biodegradable con fibroblastos alogénicos (Dermagraft).	11	Disponibilidad inmediata. Alta resistencia.	Costosa.
Matriz de nylon con fibroblastos alogénicos y silicona (TransCyte).	14	Disponibilidad inmediata.	Es temporal. No es biodegradable. Costosa.
Substituto bicapa de colágeno bovino con fibroblastos y queratinocitos alogénicos (Apligraf).	25	Disponibilidad inmediata. Sitio donador mínimo.	Vida útil corta. Costoso.
Piel cultivada compuesta de fibroblastos y queratinocitos alogénicos sembrados en los lados opuestos de la matriz de colágeno bovino (OrCel).	28	Disponibilidad inmediata.	Deficiencia de datos clínicos.
Matriz de colágeno acelular de submucosa intestinal porcina (Oasis).	8	Disponibilidad inmediata. Larga vida útil. Disminuye tiempo de cicatrización. Económica. Resistente a la infección.	Deficiencia de datos clínicos.

Tabla 1. Sustitutos de piel. Adaptado de [1].

3.2.1.1 Injertos epidérmicos

El más exitoso es *Epicel* de la compañía *Genzyme*, basado en cultivos de células epiteliales autólogas multiplicadas in vitro. Se han desarrollado algunas versiones no autólogas de *Epicel* pero sin resultados óptimos, lo cual no ha permitido su aprobación. *Advanced Tissue Sciences* investiga en colaboración de *Cell Genesys* una epidermis universal desprovista de antígenos de histocompatibilidad tipo II, que permita solucionar el problema del rechazo inmunológico a los implantes. *Fidia Advanced Biomaterials* se inclina por los polímeros biorreabsorbibles como el *Laserskin*, basado en ácido hialurónico, y *Smith & Nephew* trabaja en el desarrollo de películas portadoras de células epidérmicas capaces de transferir queratinocitos a la herida.

El principal obstáculo que se presenta con los sustitutos de tipo epidérmico es el ajuste inestable que se genera en el lugar de la lesión por la falta de un substrato adecuado que logre interactuar con el remanente dérmico de la herida, regenerando el tejido afectado con resultados funcionales y estéticos satisfactorios [1,14].

3.2.1.2 Injertos dérmicos

Biobrane, de *Dow B Hickam*, es un material bilaminado que comprende una película de nylon cubierta con una capa de silicona revestida a su vez con péptidos porcinos derivados de colágeno tipo I, que promueven el crecimiento fibrovascular, reclutando fibroblastos y endotelio en la herida.

Integra, fabricado por *Integra LifeSciences*, comprende un componente dérmico de colágeno bovino tipo I cruzado con condroitín-6-sulfato sobre una hoja de silicona.

Alloderm, de *LifeCell*, consiste en colágeno dérmico humano germinado con fibroblastos alogénicos. *LifeCell* fabrica también *Xenoderm*, dermis porcina indicada en injertos de piel para quemaduras.

Smith & Nephew está evaluando también el uso de biopolímeros de colágeno como estructuras de soporte para la administración de queratinocitos y fibroblastos.

Dermagraft, de *Advanced Tissue Sciences*, constituido por ácido poliglicólico y poliglactina (polímeros biodegradables) y sembrado con fibroblastos alogénicos. Este producto, con propiedades antibacterianas, tiene un amplio uso quirúrgico: desde sutura biorreabsorbible hasta la reparación de defectos de la pared abdominal. Enriquecido con queratinocitos los resultados son mucho mejores y más rápidos y el empleo de una matriz sin colágeno evita problemas de inmunogenicidad.

Algunos grupos europeos han tenido éxito también con matrices de colágeno-elastina sembradas con células autólogas y con matrices de colágeno de bovino y condroitín-6-sulfato, favoreciendo la penetración de las células para desarrollar una dermis neoformada.

Algunos materiales biológicos derivados del cerdo han sido comercializados como apósitos o vendas para heridas, actuando como matrices dérmicas. Es el caso de *Oasis* de *Cook Biotech Incorporated*, constituido por submucosa intestinal porcina, cuya estructura y composición bioquímica apoya la remodelación específica tejido; y *E-Z-Derm*, matriz de colágeno xenogénica (de otra especie) acelular, de la cual existen muy pocos datos clínicos [10,14].

3.2.1.3 Sustitutos bicapa

Apligraf, de *Organogenesis*, perteneciente a *Novartis* y aprobado por la FDA en 1998, se ha aplicado exitosamente para el tratamiento de epidermólisis bullosa (enfermedad cutánea que se manifiesta por una fuerza mecánica disminuida de la epidermis).

En esta categoría se encuentra también *Orcel* un gel de colágeno bovino con fibroblastos y queratinocitos alogénicos procedentes de prepucios de circuncisión para formar en una laboriosa incubación la dermis y la epidermis [1].

Varios intentos se siguen haciendo con el fin de obtener un sustituto capaz de integrar los dos componentes de la piel satisfactoriamente, con células alogénicas modificadas genéticamente o autólogas que aunque tienen el inconveniente del tiempo requerido para conseguir el tamaño de injerto apropiado, garantizan mejores resultados dada la auto compatibilidad [15].

3.3 SUBMUCOSA INTES TINAL PORCINA (SIS)

El uso de SIS, fue descubierto e identificado en el Centro de Ingeniería Biomédica de la Universidad de *Purdue*, USA, en 1987. A partir de investigaciones orientadas hacia el desarrollo de injertos vasculares óptimos, se encontró casualmente que el material compatible injertado era el de una sola capa del intestino delgado traslúcida y fuerte: la submucosa. Así que se usó para el diseño de un injerto vascularizable que se incorporara a las células huésped por su gran contenido de MEC, propiedad que le otorgaría gran aplicabilidad a futuro [2,4].

La submucosa se encuentra entre las capas muscular y mucosal del intestino delgado (figura 3), y constituye la MEC compleja 3D de colágeno que otorga resistencia al

intestino y sirve como reservorio para las citoquinas y las moléculas de adhesión celular que dirigen la reparación y el reemplazo de las células epiteliales intestinales.

La composición de esta matriz acelular puede resumirse como un compuesto de proteínas como el colágeno, lípidos y carbohidratos en niveles bajos como las GP, los PG y los GAG. Básicamente contiene colágeno tipos I, III y V y VI, GAGs (ácido hialurónico, condroitín sulfato A y B, heparina, dermatan sulfato y heparán sulfato), PGs (decorina), GPs (fibronectina) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento 2 de los fibroblastos (FGF-2), el factor de crecimiento transformador de células β (TGF- β), y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [1,2,8,16]. Por consiguiente, esta MEC puede jugar un papel crucial en los procesos de reparación, vascularización y remodelación de los tejidos [4], dando soporte a la deposición, organización y maduración de los componentes de la matriz extracelular (MEC).

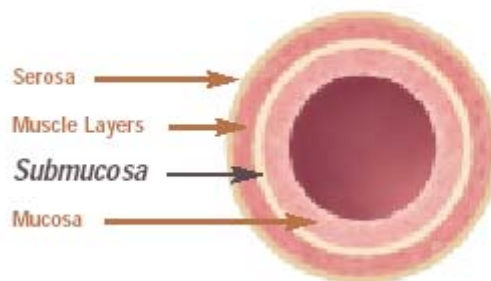


Figura 3. Sección transversal del intestino delgado (yeyuno). Tomado de [6].

La submucosa constituye un biomaterial remodelable y muy práctico dada su configuración membranosa sencilla, uniformidad relativa, absorción gradual y abundante disponibilidad. La complejidad natural de SIS entonces, promueve la regeneración en el lugar específico, una rápida neovascularización y la infiltración y organización espacial de las células del huésped con una gran resistencia a la infección. Además sobrevive en un huésped xenogénico sin producir reacciones

inmunológicas adversas, favoreciendo la proliferación controlada y la remodelación de un tejido conectivo sensitivo a fuerzas biomecánicas y del microambiente [17].

La adhesión, migración, proliferación y diferenciación con deposición de componentes de membrana basal, de células epidérmicas y fibroblastos soportados sobre SIS ya se ha demostrado, lo cual indica que este modelo compuesto puede ser útil para el estudio de las interacciones célula - matriz y para investigaciones como sustituto de piel [5].

La versatilidad de SIS y su facilidad de obtención y economía hacen de este biomaterial una herramienta muy conveniente y segura para el desarrollo de un diseño epidérmico que supla las necesidades de lesiones superficiales de gran magnitud, que puedan funcionar siempre y cuando exista un substrato dérmico celular inferior en el campo de la lesión capaz de producir MEC nueva que se acople a la MEC de SIS.

3.4 CULTIVO DE QUERATINOCITOS

El cultivo de queratinocitos humanos tuvo sus inicios en el año 1975 aproximadamente. Inicialmente todos los medios de cultivo para queratinocitos requerían suplemento de suero, como en el caso de los medios M199 y NCTC 168. Además se encontró que concentraciones de Ca^{2+} más bajas que las de los medios convencionales, eran necesarias para la proliferación óptima de queratinocitos murinos, lo cual también se cumple para el manejo de los queratinocitos humanos que responden favorablemente a concentraciones más bajas aunque distintas de Ca^{2+} [18].

Rheinwald y *Green* mejoraron el crecimiento y la formación de colonias de queratinocitos humanos, cultivándolos sobre capas alimentadoras de fibroblastos 3T3 murinos letalmente irradiados en un medio suplementado con suero y mitógenos

como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), la toxina colérica, la hidrocortisona y otros. Estos fibroblastos cuya actividad proliferativa ha sido anulada por irradiación, actúan como capas alimentadoras para los queratinocitos [11,19].

Durante la década de los 80 se desarrolló por primera vez una formulación libre de suero para cultivar los queratinocitos. Los medios libres de suero confieren una serie de ventajas durante la manipulación de los cultivos, además de representar costos más bajos que los medios séricos [18,19].

Los queratinocitos humanos generalmente no crecen para establecer líneas celulares, con excepción de la línea HaCat, única línea celular de queratinocitos espontáneamente transformados conocida hasta ahora. Los queratinocitos humanos solo pueden ser cultivados por un número variable de pasajes de 6 hasta 17 aproximadamente. Dependiendo de las condiciones de cultivo y de la edad del donante se pueden lograr hasta 100 generaciones o duplicaciones celulares. El número de generaciones celulares y la eficiencia formadora de colonias (capacidad de células aisladas viables para formar colonias en cultivo) están reducidos en aquellos queratinocitos provenientes de donantes de edad avanzada y con daño actínico por su escaso potencial de crecimiento [20].

Una variada serie de agentes influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos in vitro. La toxina colérica aumenta el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), estimulando la multiplicación de los queratinocitos y de otros tipos celulares, pero impidiendo el crecimiento de fibroblastos. El EGF a una concentración de 10 ng/ml influye principalmente sobre la periferia de las colonias, estimulando la migración celular y favoreciendo así la expansión de la colonia en forma horizontal. Sin embargo, cuando el cultivo se hace confluyente, el EGF estimula la diferenciación. La insulina también tiene un efecto positivo sobre el

crecimiento clonal, los factores de crecimiento insulinoideos son mitógenos tanto para queratinocitos normales como transformados.

Concentraciones elevadas de calcio en el medio de cultivo (por encima de 1 mM) inhiben el crecimiento de los queratinocitos e inducen su diferenciación, lo cual se observa por el aumento de la estratificación y la producción de envoltorios cornificados. Otros autores documentan que el calcio es mitogénico a concentraciones de 0.3 mM y a concentraciones más elevadas estimula la diferenciación sin inhibir el potencial de crecimiento [20, 21,22].

En el proceso de diferenciación de los queratinocitos, el calcio activa la enzima transglutaminasa, que establece puentes cruzados entre las moléculas de involucrina, precursora de los envoltorios cornificados insolubles. Niveles muy reducidos de calcio pueden incrementar la permeabilidad transepitelial y promover el desprendimiento celular por medio de la desestabilización de enlaces. Medios de cultivo libres de calcio pueden inducir lisis celular por mecanismos aún no esclarecidos [20].

3.4.1 Técnicas de aislamiento para queratinocitos

Existen varios métodos propuestos para aislar efectivamente los queratinocitos. Estos métodos requieren un tratamiento enzimático utilizando diferentes, proteasas a distintas concentraciones, para inicialmente separar la capa epidérmica, y posteriormente para disociar las células epidérmicas [19, 23,24]. Los tratamientos comúnmente encontrados son:

- Tripsina al 0.5% a 37°C durante 30 – 60 min.
- Tripsina al 0.2 – 0.25% a 37°C durante 1 – 3 h, seguido por un tratamiento con tripsina-EDTA (0.05%, 0.02 mM), durante 10 - 20 min a 37°C.

- Tripsina al 0.17 – 0.2% a 4°C durante 15 – 24 h, seguido por un tratamiento con tripsina-EDTA (0.05%, 0.02 mM), durante 10 – 20 min a 37°C.
- Dispasa al 0.5% a 37°C durante 1 h, seguido por un tratamiento con tripsina-EDTA (0.05%, 0.02 mM), durante 10 – 20 min a 37°C.
- Dispasa al 0.25% a 4°C durante 18 -24 h, seguido por un tratamiento con tripsina-EDTA (0.05%, 0.02 mM), durante 10 – 20 min a 37°C.
- Termolisina (0.5 mg/ml) durante 12 -16 h a 4°C.

Los resultados pueden variar según la viabilidad celular dada por el tipo de tratamiento utilizado.

Las proteasas o enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, por lo que son muy específicas ya que la mayoría reconocen aminoácidos o secuencias específicas. La tripsina por ejemplo, es una serina-proteasa pancreática que corta enlaces peptídicos en los que estén implicados los aminoácidos básicos arginina y lisina, como en las uniones célula - sustrato. El efecto esencial de la tripsina es hacer que las células pierdan los puntos de anclaje al sustrato, retrayendo las extensiones celulares y redondeándolas, para que al poco tiempo se desliguen de la placa de cultivo y se dispersen. Por tanto actúa sobre las integrinas o moléculas de adhesión célula – matriz.

El EDTA o ácido etilendiamino-tetraacético suele emplearse junto con la tripsina para aumentar la disociación celular, ya que actúa sobre las cadherinas de adhesión intercelular.

La dispasa o proteasa neutral, es una metaloenzima bacteriana producida por *Bacillus Polymyxa*. Es muy adecuada para la disgregación de tejidos y manejo de subcultivos, puesto que no altera la membrana celular. Particularmente, ha demostrado ser un agente rápido, efectivo e inofensivo para la separación intacta de la epidermis, puesto

que actúa sobre la región de la membrana o lámina basal, preservando la viabilidad de las células epiteliales. Normalmente los queratinocitos basales se aíslan por tripsinización de las hojas epiteliales obtenidas con dispasa. La dispasa no se inactiva con suero sino mediante lavado. Actúa sobre el colágeno tipo IV y fibronectina de la lámina basal, siendo más efectiva que la tripsina, colagenasa u otras enzimas. Las células aisladas con dispasa muestran un grado menor de lesión y presentan un mayor grado de proliferación. Sin embargo, al incrementar el tiempo de incubación y dosis de dispasa se podría observar un decremento proporcional de la viabilidad celular [23,24].

3.4.2 Medios de cultivo libres de suero para queratinocitos

Una de las primeras formulaciones libres de suero fue el M199 suplementado con un coctel de factores de crecimiento y extracto de pituitaria bovina (EPB). *Ham* y sus colaboradores fueron los pioneros del uso de medios de cultivo libres de suero para muchos tipos celulares incluyendo los queratinocitos. Estas formulaciones como la del medio MCDB 153 no requirieron el uso de capas alimentadoras, dada la adición de elementos traza (minerales), etanolamina, fosfoetanolamina, triiodotironina, hidrocortisona, EGF y el más importante, el EPB. Posteriormente, el medio MCDB 153 se fue modificando y mejorando [13,18]. La tabla 2 muestra los medios de cultivo libres de suero para queratinocitos que actualmente se consiguen en el mercado [22].

El medio Keratinocyte-SFM de *Gibco* es un medio basal con una vida útil de 9 meses aproximadamente, y que requiere de la adición de rEGF o EFG recombinante (0.1 - 0.2 ng/ml) y BPE (20 - 30 µg/ml) para su uso. La concentración de calcio es de 0.09 mM, los valores de pH están entre 7.0 y 7.4 y de osmolaridad entre 280 y 310 mOsm/kg. El medio completo puede usarse para cultivar queratinocitos epidérmicos

MEDIO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN	TIPOS DE QUERATINOCITOS
MCDB 153 (<i>Sigma</i>)	Medio basal libre de suero que requiere suplemento de EGF, insulina, fosfoetanolamina, hidrocortisona y etanolamina.	Crecimiento de queratinocitos humanos.	Queratinocitos humanos.
MCDB 153 (medio completo)	MCDB 153 suplementado listo para el uso.	Crecimiento de queratinocitos humanos.	Queratinocitos humanos.
Medio EPILIFE	Requiere uno de los siguientes suplementos: <ul style="list-style-type: none"> - Suplemento definido Epilife: albúmina sérica bovina (ASB), transferrina bovina, insulina, e hidrocortisona. - Suplemento de crecimiento corneal: EPB, insulina bovina, EGF murino, transferrina bovina e hidrocortisona. - KGF humano, EPB, insulina y transferrina bovinas, hidrocortisona y EGF humano. 	Aislamiento primario y cultivo a largo término de células epiteliales córneas humanas normales y queratinocitos epidérmicos humanos.	Células epiteliales córneas humanas y queratinocitos epidérmicos humanos.
Defined Keratinocyte-SFM. (<i>Gibco</i>)	Medio libre de suero definido para queratinocitos, bajo en proteínas, con insulina, EGF y FGF.	Crecimiento de queratinocitos humanos primarios y secundarios.	Queratinocitos humanos.
Keratinocyte-SFM (<i>Gibco</i>)	Medio libre de suero basal, que requiere EPB y EGF humano recombinante.	Estudios con substitutos dérmicos, toxicología in vitro y terapia de genes. Cultivo de células epiteliales cervicales y estudio del papilomavirus humano.	Queratinocitos humanos. Células epiteliales bronquiales.
Panserin-801	Medio libre de suero basado en MCDB-153 enriquecido con suplementos: EGF, insulina, hidrocortisona, etanolamina, BPE y fosfoetanolamina.	Cultivo de queratinocitos y prevención de la contaminación por fibroblastos.	Queratinocitos.

Tabla 2. Medios de cultivo libres de suero para queratinocitos [22].

humanos en estudios sobre sustitutos, toxicología in vitro y terapia de genes. Además ha sido exitosamente útil en el cultivo de células epiteliales cervicales y para estudiar el comportamiento de células con ADN de papilomavirus humano. También puede ser útil en el cultivo de otros tipos de células epiteliales como las bronquiales humanas que han mostrado un buen crecimiento bajo condiciones libres de suero.

3.4.2.1 Medio de cultivo “Defined keratinocyte - SFM”

El Defined Keratinocyte-SFM es un medio de cultivo libre de suero específico para queratinocitos, también de *Gibco* que se utiliza para soportar el crecimiento de queratinocitos humanos primarios y secundarios, con fines de investigación. Este medio se desarrolló obviando la necesidad de EPB como mitógeno primario, y a que el uso de éste, presenta algunos inconvenientes. La composición indefinida del EPB puede complicar los modelos experimentales y la interpretación de resultados, y a que sus efectos pueden ser inhibitorios o estimulantes sobre los cultivos de queratinocitos, dependiendo de su concentración y de la presencia de otros componentes y sus respectivas concentraciones, además de requerir de dosificación dentro de sistemas diferentes y limitar la estabilidad del medio a 4 semanas.

El medio Defined Keratinocyte-SFM elimina el requerimiento de EPB por la inclusión de aditivos promotores del crecimiento como la insulina, el EGF y el FGF. Es efectivo para el mantenimiento de queratinocitos primarios y se ha asociado a un crecimiento celular primario superior al de otros medios, conservando los marcadores morfológicos y fisiológicos de las células.

El mitógeno más importante incluido en el suplemento de crecimiento para el Defined Keratinocyte-SFM es el rEGF. Éste es un factor de crecimiento epidérmico humano recombinante de E.Coli. Es un factor de crecimiento polipeptídico que estimula la proliferación de un amplio rango de células epiteliales. Para la mayoría

de aplicaciones in vitro, el EGF ejerce su actividad biológica dentro de un rango de concentración de 0.5 a 25 ng/ml [18].

4. METODOLOGÍA

En este capítulo se explican las herramientas y métodos desarrollados para llevar a cabo el procedimiento de aislamiento y cultivo de los queratinocitos, con y sin SIS.

4.1 MATERIALES

Los materiales para la realización de este trabajo se seleccionaron teniendo en cuenta los usados regularmente en la mayoría de técnicas para aislamiento y cultivo celular, y que a su vez, se adaptaron mejor a las condiciones de trabajo en el laboratorio por su economía y/o facilidad de consecución. Se emplearon materiales biológicos (tejido fuente de queratinocitos y SIS), reactivos e instrumentos de laboratorio.

4.1.1 Fuente celular

Se procesaron muestras de prepucios infantiles obtenidas de menores circuncidados en el departamento de Cirugía Pediátrica de la Clínica Colsubsidio de Bogotá. Aprobación otorgada por el Comité de Bioética de la Institución (anexo A), teniendo en cuenta las consideraciones logísticas y bioéticas del caso (anexo B), y el formato correspondiente de consentimiento informado (anexo C).

4.1.2 Reactivos

- **PBS (Dulbecco's phosphate buffer solution) sin Ca/Mg:** KCl 0.2 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8 g, Na_2HPO_4 anhidro 0.92 g. Se lleva a 1 L con agua destilada y desionizada, y pH=7.0. Se esteriliza con calor y filtro de 0.22 μm , y se conserva a 4°C. Esta solución mantiene el pH apropiado y el balance osmótico mientras que las células son lavadas para remover los inhibidores de proteasa presentes en el

suero animal. También se usó como medio o *buffer* para preservar las muestras de tejido.

- **Antibiótico:** Solución de Penicilina – Estreptomicina. Cat. No. 15140, Gibco, 10.000 unidades de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomicina.
- **Dispasa:** Cat. No. 17105, Gibco, preparada al 0.5% y filtrada a través de una membrana de 0.22 µm. Se almacenan a -80°C alícuotas de 5 ml para cada muestra. Generalmente logra la separación efectiva y suavizada de la hoja epidérmica intacta, a 4°C durante 16-20 h, o a 37°C durante 4-6 h.
- **Tripsina – EDTA:** Cat. No. 25300, Gibco. Solución de tripsina al 0.05% con EDTA*4Na 0.53 mM. Contiene 0.5 g/L de tripsina (1:250) y 0.2 g/L de EDTA*4Na en solución salina balanceada de Hanks, sin CaCl₂, MgCl₂ y MgSO₄. Se emplearon inicialmente otras concentraciones de tripsina superiores que no presentaron resultados satisfactorios de viabilidad celular.
- **Medio completo de cultivo:** Cat. No. 10744, Gibco, medio libre de suero específico para queratinocitos. Se seleccionó este medio comercial, ya que no requiere ser suplementado con suero bovino fetal y su composición incluye los mitógenos necesarios para mantener a los queratinocitos proliferantes, como la insulina, el EGF y el FGF-2.

Consta de un medio basal en presentación de 500 ml y un suplemento de crecimiento congelado de 1 ml que se debe adicionar al momento de uso. El suplemento presenta una coloración ligeramente ámbar y no se debe someter a ciclos de congelamiento y descongelamiento. El medio completo debe almacenarse dentro de un rango de temperatura de 2 a 8°C.

Tanto el medio basal como el suplemento de crecimiento tienen una vida útil de 12 meses aproximadamente por separado y una vez mezclados este periodo se reduce a 90 días bajo condiciones normales de uso [18].

- **Suero bovino fetal (SBF):** Se utilizó como suplemento del medio de cultivo al 10%, para inactivar la acción de la tripsina durante el proceso de aislamiento celular, y para hidratar las láminas de submucosa antes de sembrar la suspensión celular.

- **Azul de tripán:** Cat. No. T8154, Sigma-Aldrich. Colorante ácido azul recomendado como tinte vital para estimar la proporción de células viables en las poblaciones celulares. Su cromóforo está cargado negativamente, por lo cual no reacciona con las células a menos que la membrana esté dañada o lesionada. La tinción facilita la visualización de la morfología celular.

- **Rodamina B:** Cat. No. R6626, Sigma-Aldrich. Preparada al 1% en agua destilada. Tiene una afinidad específica por las células epidérmicas, por lo cual permite distinguir las diferentes poblaciones celulares. Reacciona con los filamentos intermedios celulares, tiñendo de rosado las estructuras queratinizadas de las células epidérmicas.

- **Láminas de SIS:** Los soportes de submucosa fueron donados por el grupo de investigación de Ingeniería de Tejidos de la Universidad de los Andes. Estas membranas vienen deshidratadas y esterilizadas con óxido de etileno. Su hidratación y uso se lleva a cabo por lo menos a los 4 días después de la esterilización para darle tiempo a la eliminación total de los residuos de óxido que son tóxicos para las células.

- **MTT** (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide): Esta solución amarilla es útil para verificar la viabilidad celular y medir de modo indirecto la proliferación. Las células activas metabólicamente reducen el MTT, en parte por la acción de las enzimas deshidrogenasas, generando equivalentes de reducción como el NADH y el NADPH. La formación púrpura intercelular resultante se solubiliza y cuantifica por medio de espectrofotometría. El MTT presenta valores de absorbancia cercanos a cero (± 0.1) en ausencia de células, y los valores típicos de absorbancia cuando hay células viables generalmente se encuentran entre 0.75 y 1.25. Para cada tipo celular existe una relación lineal entre el número de células y la señal producida, lo cual permite cuantificar de modo aproximado los cambios en la tasa de proliferación celular [28].
- **Isopropanol ácido:** Isopropanol con (HCl 0.04 M). Usado para lisar las células después de la tinción con MTT y solubilizar los precipitados violetas intercelulares.

4.1.3 Instrumentos de laboratorio

- **Materiales de laboratorio estériles:** Cajas de petri de 9 cm, frascos de cultivo de 25 cm², cajas de cultivo de 6 y 24 pozos, pipetas de 2, 5 y 10 ml, pipetas Pasteur, tubos eppendorf y falcon de 15 y 50 ml, equipo básico de disección (pinzas, tijeras y bisturí), filtros de 0.22 μ m, micropipetas y puntas.

Los frascos de cultivo con tapas ventiladas son recomendables porque a parte de reducir la contaminación y el riesgo de derrames del fluido, permiten un intercambio gaseoso adecuado.

- **Equipos de laboratorio:** Cámara de flujo laminar, centrífuga, incubadora con CO₂, pipeteador, agitador orbital, vortex, microscopio invertido, cámara de Neubauer o hemocitómetro y espectrofotómetro.

4.2 VARIABLES DE ESTUDIO

Las dos variables a evaluar en los cultivos son la tasa de crecimiento celular (TC) y la eficiencia formadora de colonias (EFC).

Una colonia se define como un grupo de cuatro o más células contiguas cuya apariencia sugiere que han sido originadas a partir de una sola célula. Una colonia con un área mayor a 1 cm² (aproximadamente 1.8 x 10⁵ células) se define como megacolonia.

La TC estima el incremento diario en el diámetro de las colonias o la expansión diaria de las colonias en mm/día. Esta medición se inicia, una vez se distingue el comienzo de la formación de las colonias en los cultivos, a los 5-6 días de la siembra. Se promedian los valores de crecimiento observados en algunas de las colonias, para determinar la TC de las células viables aisladas de cada muestra de tejido.

Después de 6 días de cultivo, los queratinocitos presentan un crecimiento exponencial, migran hacia la periferia de la colonia describiendo un área circular. De los 8 a 12 días de cultivo, las colonias entran en una fase de crecimiento lineal en la cual su radio se incrementa de modo constante. La TC en cultivos de queratinocitos sin sustrato puede variar entre 0.18 mm/día en ausencia de factores de crecimiento, hasta 1.42 mm/día en presencia del factor de crecimiento epidérmico [23].

La EFC representa la capacidad de las células aisladas viables para formar colonias en cultivo (ecuación 1), y se determina realizando la tinción con rodamina B de alguno de los cultivos procedentes de la muestra. Usualmente, la EFC de queratinocitos de cultivos primarios sin sustrato fluctúa entre 0.1 y 1%, y aumenta con los subcultivos entre 30 y 80%. Hacia el final de su vida en cultivo, la EFC de queratinocitos provenientes tanto de ancianos como de recién nacidos declina hasta valores por debajo del 1% [20].

$$EFC = \frac{\#colonias \ de \ queratinocitos}{\#queratinocitos \ sembrados} \times 100 \quad (1)$$

4.3 PROCEDIMIENTO

4.3.1 Medida de la viabilidad celular

La viabilidad de las células aisladas a partir de cada muestra de prepucio se realizó a través de la dilución de la suspensión celular en azul de tripán.

Se lleva a cabo una mezcla de 50 μ l de la suspensión celular obtenida y 50 μ L del tinte para obtener un factor de dilución igual a 2, resuspendiendo con ayuda de un vòrtex. Se monta una laminilla sobre la cámara de Neubauer y se coloca una gota de la mezcla para que se expanda uniformemente por capilaridad en uno de los cuadrantes de conteo de la cámara.

La cantidad de células viables obtenida en el volumen de la suspensión (V), se define en la ecuación 2 y se obtiene teniendo en cuenta la dimensión del cuadrante de

conteo, el factor de dilución utilizado ($Fd=2$) y la totalidad de células vivas (no teñidas) presentes en el cuadrante visto al microscopio (N). De este modo también se determina el porcentaje de viabilidad celular de acuerdo con la proporción de células vivas y muertas observadas. La dimensión de un cuadrante de conteo de la cámara es de 1 mm x 1mm x 0.1 mm, es decir de 1×10^{-4} ml.

$$No. de Cèlulas = N \times Fd \times 1 \times 10^4 \times V \quad (2)$$

Se estima que las suspensiones celulares con una cantidad igual o superior a 1×10^6 células vivas / ml, son más viables para la obtención de una monocapa de cultivo primario [19].

4.3.2 Protocolo de cultivo

El protocolo estandarizado para llevar a cabo el aislamiento de las células epidérmicas a partir de los prepucios y su cultivo, se basó en técnicas ya expuestas por algunos autores [19-21,24-27] y en las adaptaciones necesarias de acuerdo con las instalaciones y materiales disponibles en el laboratorio (figura 4).

Las muestras de tejido de experimentación se preservan en un tubo falcon de 50 ml con 20 ml de PBS con antibiótico al 1% y a 4°C, durante su transporte de la sala de cirugía al laboratorio, para su procesamiento preferiblemente inmediato. En algunos casos, las muestras se mantuvieron en esta solución 2 o 3 días máximo antes de ser manipuladas.

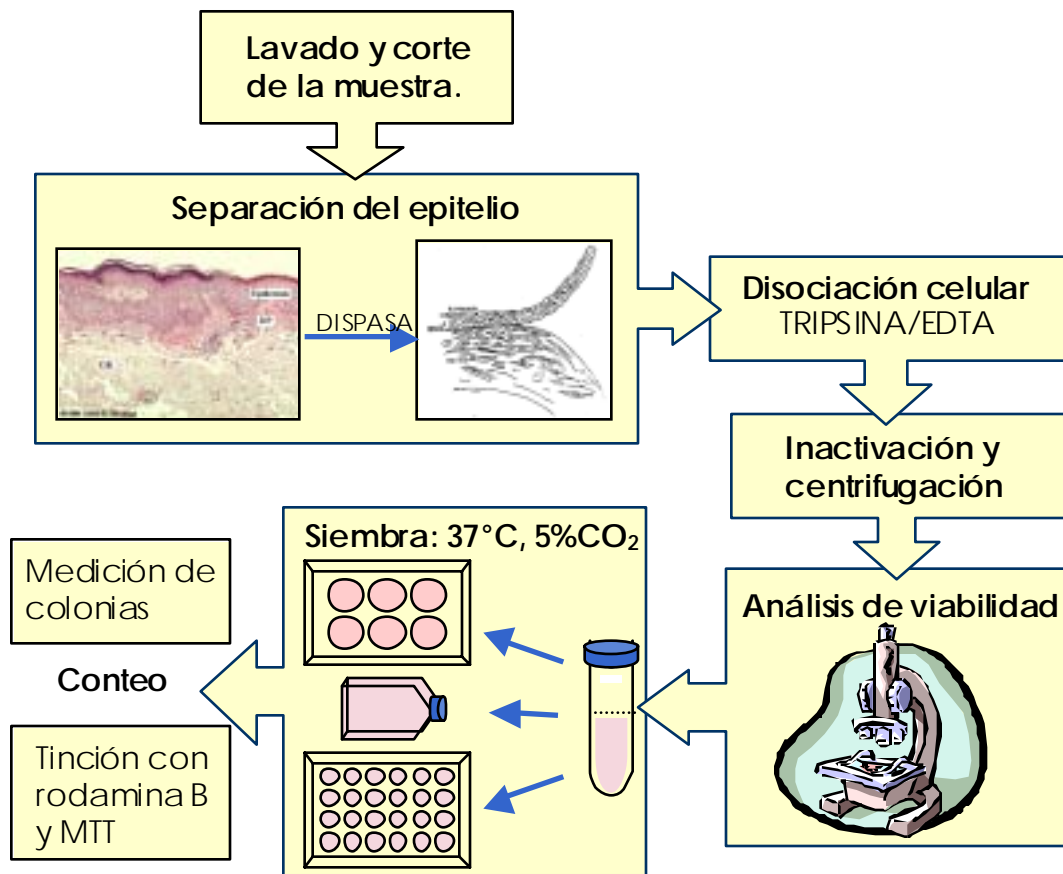


Figura 4. Esquema del protocolo de aislamiento y cultivo de queratinocitos.

Todo el procedimiento se realiza en cámara de flujo laminar y bajo estrictas medidas de asepsia, utilizando mechero y materiales estériles expuestos a radiación UV durante 15 – 20 min antes de cada procedimiento para disminuir al máximo las posibilidades de contaminación.

La muestra de tejido se extiende y se lava con PBS y antibiótico al 1% en una caja de petri. Se realizan cortes homogéneos de aproximadamente 0.25 cm^2 , quitando en lo posible el tejido subcutáneo, y estos cortes se pasan a otra caja para ser sumergidos

durante 30 segundos en alcohol al 70%. Después se lavan nuevamente con PBS y antibiótico.

El aislamiento de las células de interés se realiza mediante dos fases de digestión enzimática. La primera con dispasa para separar la capa epitelial de la piel y la segunda con tripsina – EDTA para disociar las células epidérmicas. Los segmentos se dejan sumergidos en 5 ml de dispasa durante 18 h a 4°C, o alternativamente durante 6 h a 37°C. Después de este tiempo se nota un desplazamiento discreto de la epidermis sobre la dermis y con ayuda de pinzas, las láminas epidérmicas se retiran cuidadosamente del tejido remanente (dermis y tejido subcutáneo o adiposo), para ser tripsinizadas dos veces durante 10-15 min, pipeteando cada 3 minutos para facilitar la disociación de las células. Las suspensiones celulares obtenidas después de cada tripsinización se resuspenden en un tubo de 15 ml con medio de cultivo suplementado con SBF al 10% para inactivar la tripsina. La mezcla de la primera tripsinización se conserva en la incubadora mientras se tripsinizan por segunda vez las membranas epidérmicas.

Toda la suspensión resultante se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 10 min y a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspende en 1 o 2 ml de medio para determinar la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán y conteo en cámara de Neubauer.

De acuerdo con la cantidad de células resultante, se lleva a cabo la dilución de la suspensión celular en el medio de cultivo libre de suero, sembrando 1.5×10^6 células por pozo en 1.3 ml de medio de cultivo, para las cajas de 6 pozos; aproximadamente 1×10^5 células por pozo en 0.5 ml de medio, para las cajas de 24 pozos y 3×10^6 células en 2 ml de medio por frasco de cultivo de 25 cm².

Se utilizaron tres áreas diferentes de cultivo (figura 5), ya que las cajas de 6 pozos son más útiles para medir y teñir las colonias, los frascos más útiles para obtener monocapas más grandes de queratinocitos que puedan ser subcultivados y para llevar a cabo las pruebas de cultivo sobre submucosa son más indicadas las cajas de 24 pozos.

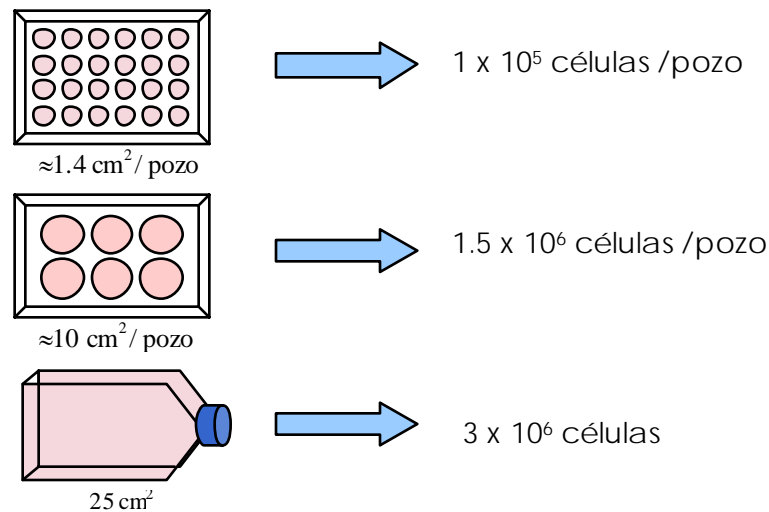


Figura 5. Superficies de cultivo utilizadas.

Los cultivos se mantienen a 37°C , en atmósfera húmeda con 5% CO_2 . A los dos o tres días cuando las células ya se observan adheridas a la superficie de cultivo, se realiza el primer cambio de medio para quitar los residuos epiteliales y las células muertas. Los siguientes cambios de medio se hacen cada 3 días, según el aspecto del medio colocando algo más de medio a cada pozo a partir del tercer cambio cuando ya se observen colonias en plena etapa de crecimiento.

Las colonias se midieron diariamente a partir del día 5-6 hasta el día 10-11 cuando comienzan a unirse para formar la confluencia, usando una rejilla de 1 mm de precisión (figura 6).

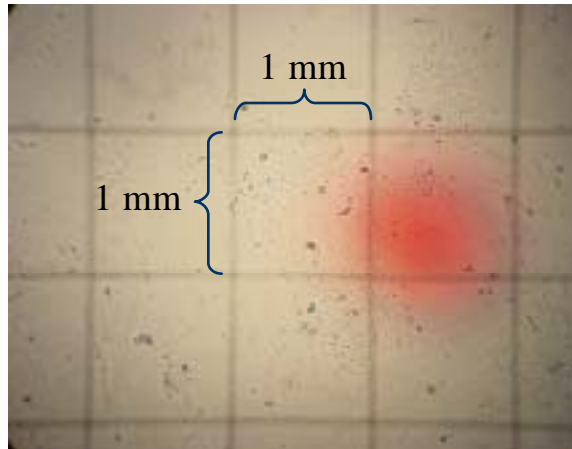


Figura 6. Rejilla de medición de colonias, 4X.

La coloración con rodamina debe llevarse a cabo antes de que los cultivos alcancen un 60% de confluencia (día 8) para poder visualizar y contar las diferentes colonias. El medio de cultivo se aspira y se agregan 0.5 ml de rodamina a cada placa. Luego de 30 min los cultivos se lavan cuidadosamente con agua hasta que las colonias muestren un color rojizo brillante. Las placas permanecen destapadas para el secado y el posterior conteo de las colonias.

Teniendo en cuenta que la distribución de las colonias en el área de cultivo es homogénea, el conteo del número total de colonias presentes en un cultivo se realizó contando la cantidad de colonias presentes en el área máxima vista al microscopio (16 mm^2) y aproximando al área total de la superficie de cultivo.

Las mediciones del tamaño de las colonias y las tinciones con rodamina para estimar la EFC se realizaron sobre cultivos creciendo en cajas de 6 pozos (área aproximada de 9.1 cm^2 por pozo), y se seleccionaron mínimo 3 colonias por cultivo para el seguimiento de crecimiento.

Para los cultivos sobre SIS en cajas de 24 pozos, las láminas de SIS se cortan cuidadosamente con un bisturí estéril para ser colocadas en cada pozo. Se hidratan durante 18-24 horas con 400 μ l de SBF y antibiótico al 5% por pozo. Esta mezcla de aspira y se colocan 350 μ l de la suspensión celular en agitación durante 1 hora, para luego adicionar más medio de cultivo. La submucosa se cambia de pozo al tercer día para descartar las células no adheridas.

Los pozos con submucosa se tiñeron con MTT. Se aspira parte del medio de cultivo de cada pozo y se agregan 30-40 μ l de MTT por pozo. Se incuba de 2 a 4 horas hasta observar el precipitado púrpura en las células y se agregan 300 μ l del reactivo de lisis celular (isopropanol ácido). Se agita un poco para asegurar la mezcla y después de 30 min se retira la submucosa para medir la absorbancia de los pozos, incluyendo un blanco como control y seleccionando un filtro para la longitud de onda adecuada (570 nm).

Los subcultivos o pases deben llevarse a cabo una vez las placas alcanzan un 75% de confluencia, para evitar que se inicie el proceso de estratificación acentuado. Para esto los cultivos se lavan con PBS y se aplica la solución de tripsina-EDTA a 37°C. Las cajas se observan al microscopio cada minuto y se golpean lateralmente para ayudar a despegar las células rápidamente. Cuando un 90% de las células estén despegadas (aproximadamente a los 5 min), se retira la tripsina y se inactiva el residuo con medio suplementado al 10% con SBF, pipeteando vigorosamente para promover al máximo el desprendimiento de las células. Se centrifuga y se hace el conteo celular repartiendo el *pellet* obtenido en dos pozos diferentes.

5. RESULTADOS

Todas las muestras de prepucio procesadas fueron tomadas de pacientes circuncidados de raza mestiza de 2 hasta 12 años de edad.

En la tabla 3 se presentan las muestras de tejido a partir de las cuales se consiguió la estandarización del aislamiento y cultivo correctos de las células (protocolo explicado en el numeral 4.3.2). Las muestras que inicialmente se procesaron con otros métodos de aislamiento y cultivo diferentes, que incluyeron tripsinización a otras concentraciones y tiempos, disgregación mecánica del tejido y cultivo de los explantes no se detallan ya que no presentaron resultados satisfactorios.

Muestra	Edad (años)	Tamaño de la muestra (cm ²)	Células/ml	Viabilidad (%)	Método de aislamiento
1	12	2,5	8,0E+06	40	Dispasa 6 h, 37°C + tripsina/EDTA
2	8	2,5	6,4E+06	45	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
3	8	2	6,0E+06	35	Dispasa 6 h, 37°C + tripsina/EDTA
4	6	2	7,0E+06	30	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
5	6	1,5	4,5E+06	25	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
6	5	1,5	7,2E+06	40	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
7	4	2	5,3E+06	30	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
8	9	2,5	1,0E+07	60	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
9	10	2,5	1,1E+07	40	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
10	8	2	6,4E+06	50	Dispasa 6 h, 37°C + tripsina/EDTA
11	9	2,5	7,1E+06	60	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
12	10	2,5	3,3E+06	50	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
13	7	2	2,3E+06	50	Dispasa 18 h, 4°C + tripsina/EDTA
Valor promedio			6,5E+06	42,7	

Tabla 3. Muestras procesadas para la estandarización de la técnica de cultivo.

Para adquirir una población más pura y sana de queratinocitos primarios, fue necesario el uso de dispasa para separar solamente el tejido epidérmico de la muestra,

y el uso de tripsina/EDTA en concentración muy baja (0.05%) y tiempos no superiores a 15 min por tripsinización para no alterar en lo posible la integridad de las células. Experimentos previos demostraron que el uso de tripsina al 0.25% o de mayor concentración, incluso por periodos más cortos, es muy nocivo para las células, generando densidades muy bajas de células vivas y por tanto cultivos no viables.

El tiempo de digestión enzimática de las muestras con dispasa no alteró significativamente la supervivencia de las células, ya que muestras sometidas al tratamiento con dispasa durante 18 h a 4°C, presentaron viabilidades muy similares a las obtenidas de muestras tratadas durante 6 h a 37°C con la dispasa.

Teniendo en cuenta que las muestras fueron procesadas bajo un mismo método de aislamiento celular, no se presentó una relación directamente proporcional entre la edad de los donantes y el porcentaje de viabilidad celular (figura 7), y además muestras de un mismo tamaño originaron diferentes cantidades de células viables (gráfica 8), lo cual demuestra que probablemente otros factores relacionados con el estado o condición del paciente pueden intervenir.

Para conseguir las densidades celulares requeridas para cada caja o frasco de cultivo, las láminas epidérmicas deben tripsinizarse 2 veces para recolectar la mayor cantidad posible de células, teniendo en cuenta que no todos los queratinocitos que conforman la epidermis tienen posibilidades de dividirse en cultivo. Muchos de ellos ya muy diferenciados o queratinizados y anucleados son funcionales in vivo, no son teñidos por el azul de tripán, y aunque se adhieren a la superficie de cultivo no pueden proliferar para formar colonias. Esta clase de queratinocitos son de mayor tamaño y presentan una morfología más aplanada (fotografía 1).

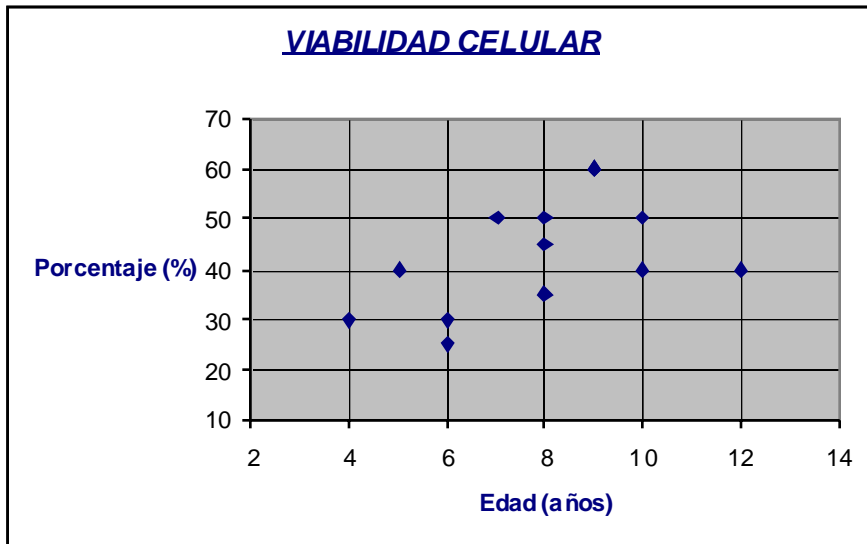


Figura 7. Viabilidad celular Vs. Edad del paciente.

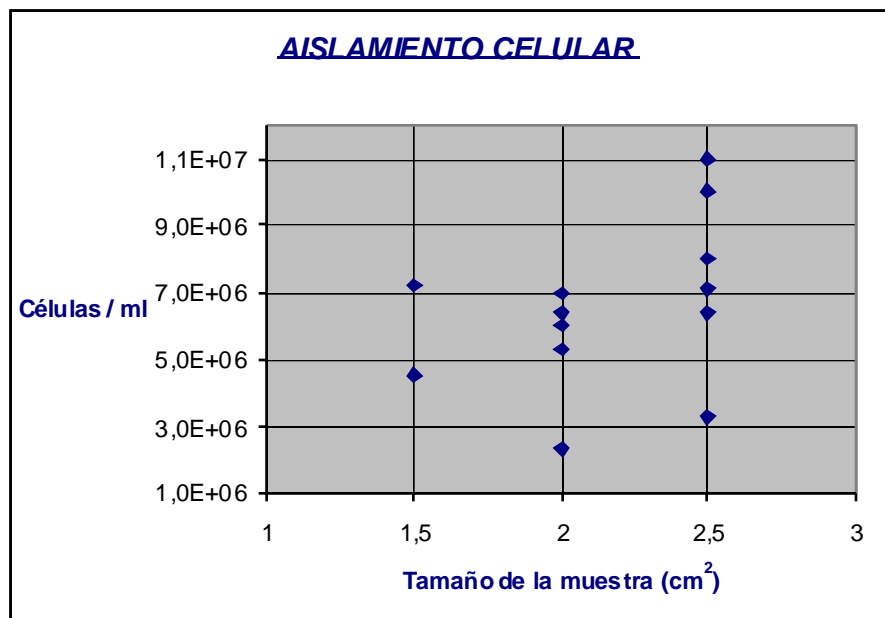
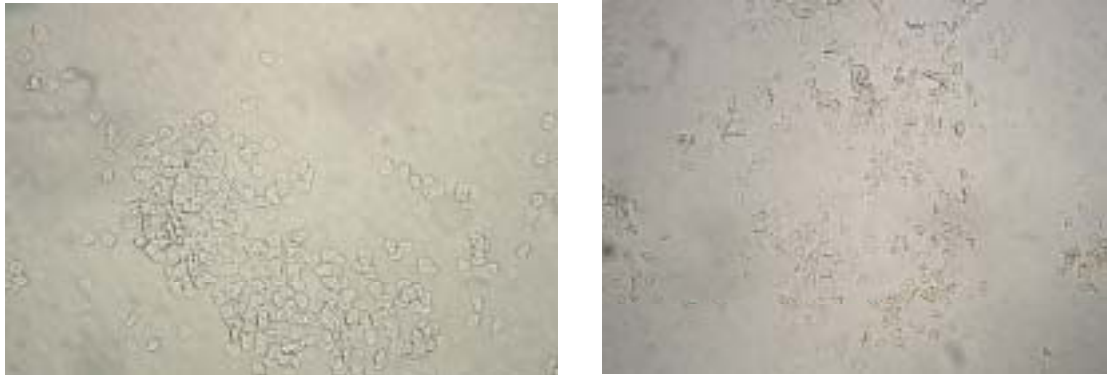


Figura 8. Cèlulas vivas/ml Vs. Tamaño de la muestra.

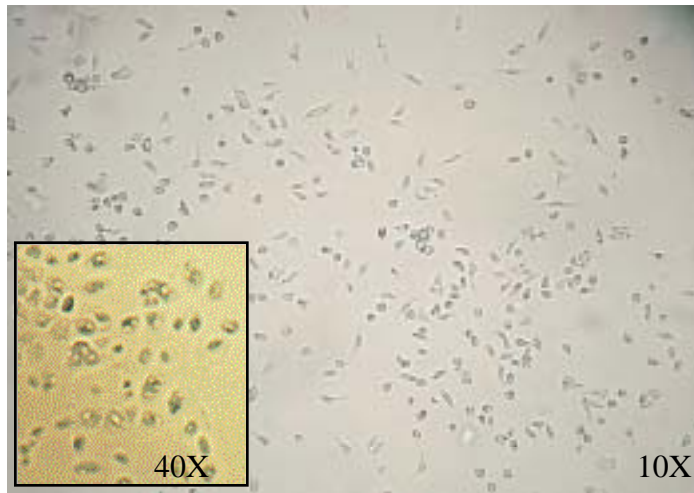


Fotografía 1. Grupos de células queratinizadas no proliferantes, 10X.

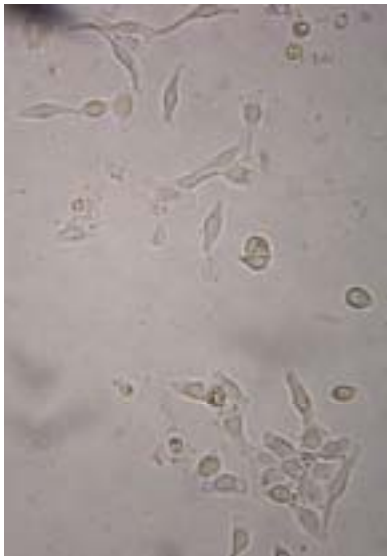
Al tercer día de cultivo, con la ayuda del microscopio invertido, las células viables adheridas se observan refringentes y aún un poco redondeadas (fotografía 2). Las células se disponen a dividirse y a formar colonias a partir del día 4-5. Al tratar de migrar para agruparse adquieren una forma un poco alargada como se observa en la fotografía 3. Las colonias conformadas por 3 o más células comienzan a observarse a partir del día 6 (fotografía 4). Inicialmente estas colonias presentan formas redondeadas y al crecer se van alargando y deformando (fotografía 5) tendiendo a la confluencia. Las fotografías 6 y 7 muestran cultivos confluentes con la morfología poligonal de uniones muy estrechas, típica de los queratinocitos.



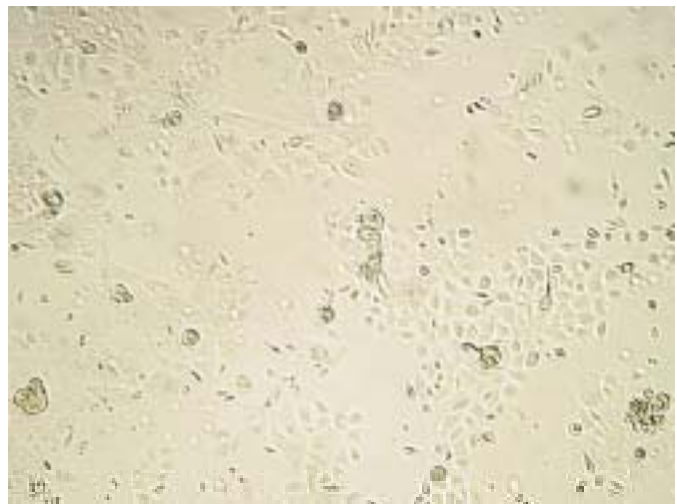
Fotografía 2. Adhesión celular al tercer día de cultivo, 10X.



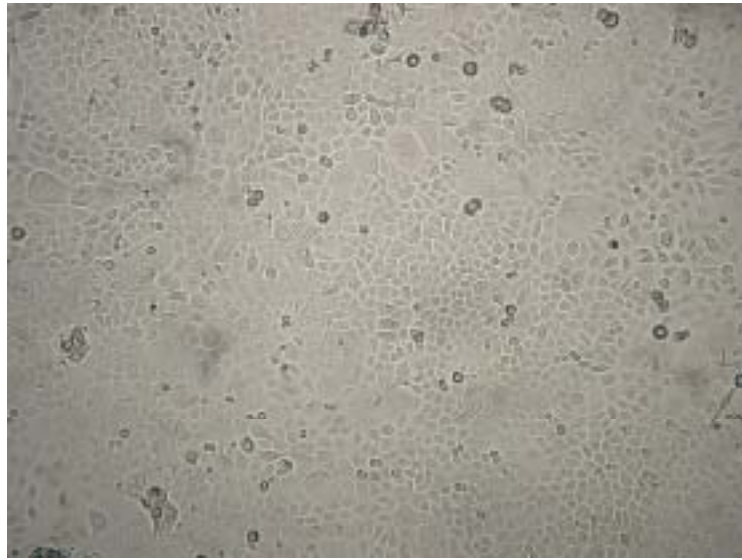
Fotografía 3. Cultivo, días 4-5.



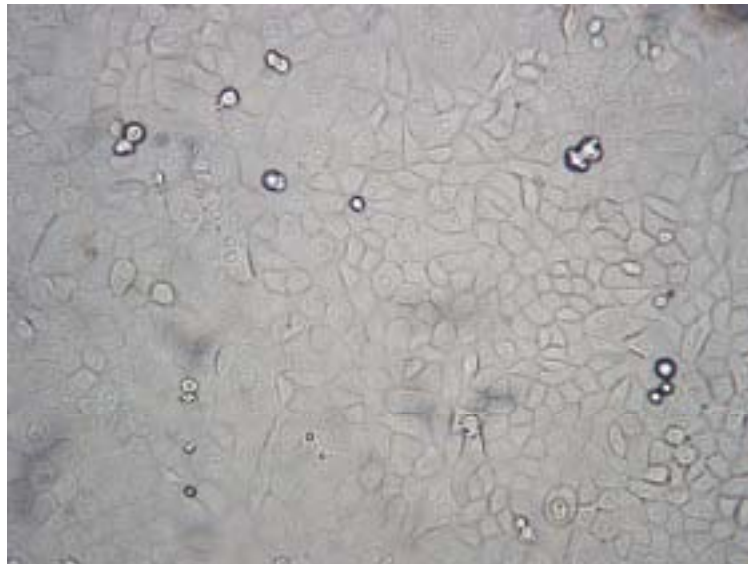
Fotografía 4. Formación de colonias, día 6, 20X.



Fotografía 5. Colonias, día 9, 4X

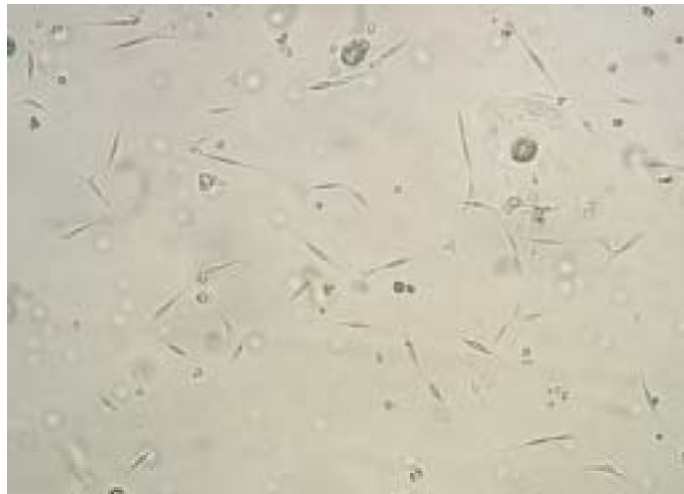


Fotografía 6. Monocapa confluyente, día 12, 10X.

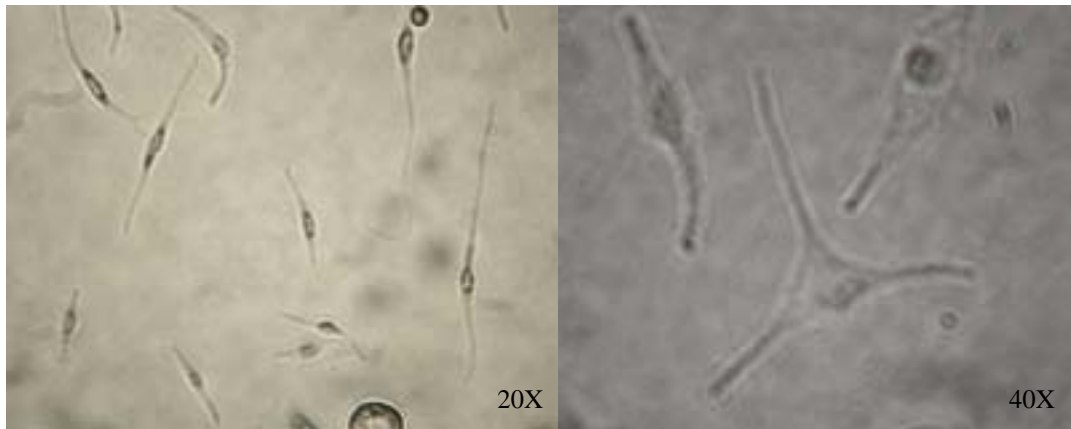


Fotografía 7. Monocapa confluyente, día 12, 20X.

En algunos cultivos se observaron algunos tipos celulares contaminantes aislados (fotografía 8), que probablemente por la naturaleza selectiva del medio de cultivo para queratinocitos fueron desapareciendo. La morfología de estas células contaminantes es típica de fibroblastos (más fusiformes) y sobretodo de melanocitos, muy evidentes por sus prolongaciones dendríticas (fotografía 9).

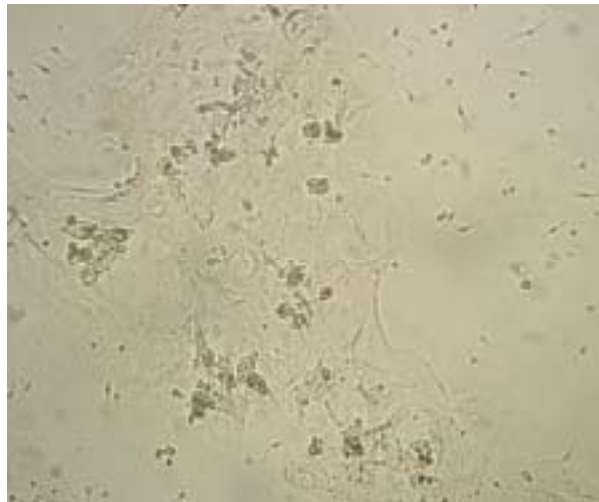


Fotografía 8. Tipos celulares contaminantes, día 10, 10X.



Fotografía 9. Melanocitos contaminantes, día 10.

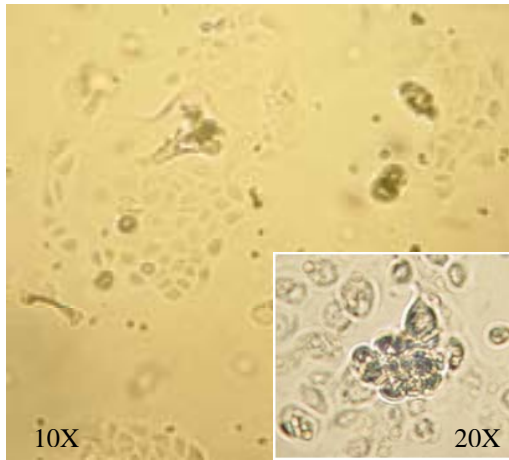
La selectividad del medio de cultivo se verificó adicionando 10% de SBF a uno de los cultivos desde el comienzo. Esto evidenció la supervivencia y crecimiento de fibroblastos y en menor proporción de melanocitos en el cultivo, dando como resultado un cultivo con morfologías combinadas y colonias de queratinocitos muy diferenciadas (fotografía 10).



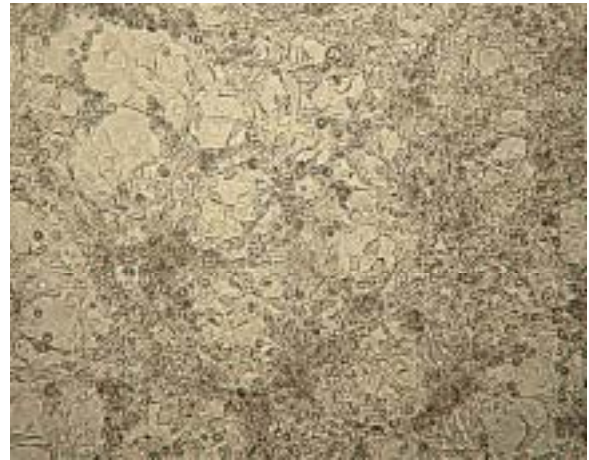
Fotografía 10. Células cultivadas con 10% de SBF, día 10, 10X.

La mayoría de colonias de mayor tamaño presentaron focos de diferenciación terminal de los queratinocitos (fotografías 11 y 12), comportamiento similar al que experimentan in vivo durante la diferenciación terminal cuando los queratinocitos se desplazan de la capa basal de la epidermis hacia arriba, perdiendo contacto con la membrana basal; demostrando que la diferenciación celular in vitro implica pérdida de la adhesividad con el sustrato de cultivo.

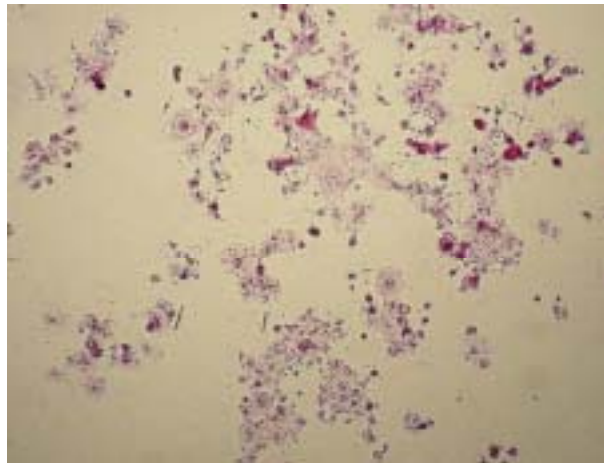
La coloración con rodamina evidenció las colonias de queratinocitos y las células más diferenciadas captaron el tinte con mayor intensidad (fotografía 13).



Fotografía 11. Focos de diferenciación terminal, día 10.



Fotografía 12. Estratificación, día 18,10X.



Fotografía 13. Coloración de colonias con rodamina, día 12, 10X.

En la tabla 4 se muestran los valores de TC promedio y de EFC obtenidos a partir de cultivos de 5 de las muestras consignadas en la tabla 3. Debido a problemas de contaminación originados en las demás muestras, no fue posible llevar a cabo el seguimiento completo para ninguno de sus cultivos, por lo cual para las demás muestras no logró medirse la TC ni la EFC, sino únicamente la viabilidad antes de la siembra.

MUESTRA	TC promedio (mm/día)	EFC (%)
5	0.47	0.18
6	0.20	0.19
7	0.60	0.28
8	0.73	0.23
10	0.57	0.20

Tabla 4. TC promedio y EFC resultantes.

Las mediciones y cálculos realizados se especifican en el anexo D, así como las curvas de crecimiento de las colonias de queratinocitos para cada una de las 5 muestras. Los valores resultantes se encuentran dentro de los rangos estimados para cultivos primarios de 0.18 – 1.42 mm/día para la TC y 0.1 – 1% para la EFC. No todas las colonias de un cultivo presentaron el mismo crecimiento. Unas crecieron más que otras, pero en general, las colonias crecen más rápidamente al comienzo (hasta el día 8 o 9) que al final de los cultivos.

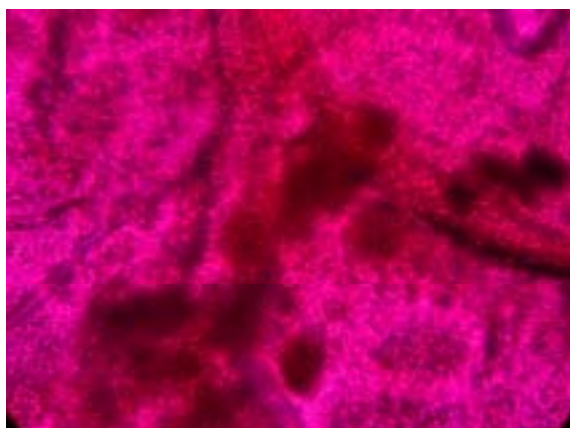
La fotografía 14 muestra la textura de la submucosa después de 24 horas de hidratación y la fotografía 15 células adheridas sobre SIS a los 3 días del cultivo celular después de cambiar de pozo la membrana. En la fotografía 16 se observa la apariencia de un cultivo sobre SIS coloreado con rodamina. Aunque las estructuras celulares adquieren esta tinción con mayor intensidad, la submucosa lo absorbe notablemente, por lo que para los cultivos sobre SIS, la coloración debió hacerse con MTT para visualizar claramente si las estructuras que se ven adheridas a la submucosa son colonias de células viables o no (fotografía 17).



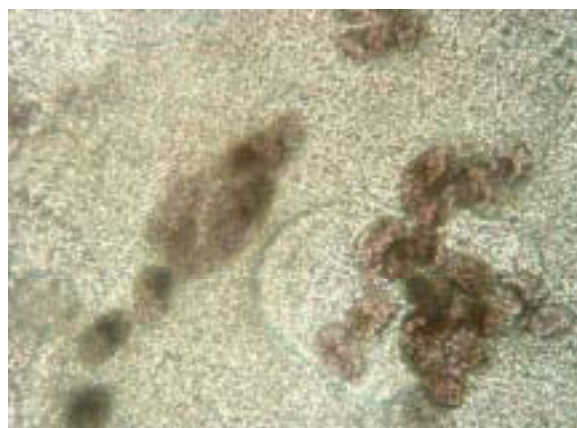
Fotografía 14. SIS hidratada, 10X.



Fotografía 15. SIS con células, día 3, 10X.



Fotografía 16. Coloración de un cultivo sobre SIS con rodamina, día 9, 20X.

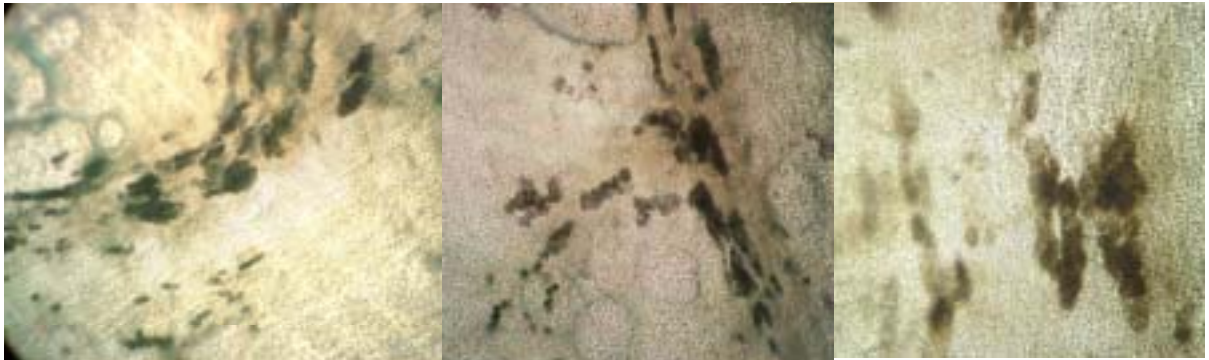


Fotografía 17. Tinción de un cultivo sobre SIS con MTT, día 9, 20X.

Las fotografías 18 y 19 muestran cultivos sobre submucosa teñidos con MTT. La apariencia de los cultivos de células primarias y de cultivos de células de primer pase es muy similar. Ambos presentan un crecimiento muy limitado y direccionado por las irregularidades propias del material (membranas de submucosa), lo cual impide la formación de colonias de diámetro medible.



Fotografía 18. Tinción con MTT, células de cultivo primario, día 9, 10X.



Fotografía 19. Tinción con MTT, células de primer pase, día 12, 10X.

Los cultivos sobre submucosa demostraron un crecimiento muy pobre a los 12 días, cuando normalmente los cultivos sin submucosa llegan a la confluencia y los índices de absorbancia medidos (tabla 5) no se encuentran dentro del rango de valores estimados cuando hay presencia de células en un pozo de cultivo.

POZO	TIPO DE CÉLULAS SOBRE SIS	ÍNDICE DE ABSORBANCIA
1	Primarias	0.1
2	Primarias	0
3	Primer pase	0.3
4	Primer pase	0.1
Blancos		0.02

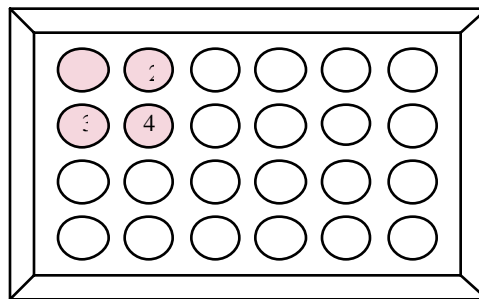


Tabla 5. Índices de absorbancia de cultivos sobre submucosa.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Son de vital importancia los pasos de lavado a los que deben ser sometidas las muestras de tejido, antes de su manipulación para el aislamiento de las células, con el fin de reducir al máximo los riesgos de contaminación. Debido a que en muchos de los casos los prepucios ya vienen contaminados, dados los procesos infecciosos desarrollados *in situ*, éstos deben lavarse usando PBS con antibiótico y desinfectarse con alcohol sin excederse en tiempo para no disminuir significativamente la viabilidad de las células.
- Los cultivos sobre submucosa, pueden requerir células de un subcultivo avanzado (tercer o cuarto pase) con mayor fracción de crecimiento y homogeneidad, ya que las células de cultivo primario, generalmente están sometidas a mucho estrés siendo muy poco resistentes y además tienden a ser heterogéneas o de varios tipos, a pesar de la selectividad de la separación del tejido epidérmico que permite la dispa.
- Debido a que no es posible evaluar el crecimiento de los queratinocitos sobre la submucosa, determinando el aumento diario en el tamaño de colonias, se debe emplear otro método indirecto como la tinción con MTT y su cuantificación; de tal modo que sea posible correlacionar los índices de absorbancia obtenidos con un número aproximado de células en crecimiento. Para esto se requieren más pruebas para las cuales pueden utilizarse otros tipos de tratamientos de superficie como controles adicionales a los cultivos sin sustrato, como por ejemplo los

constituidos por colágeno o la poli-lisina que al cubrir las superficies de cultivo incrementa el número de puntos positivos disponibles para los enlaces celulares.

- Además de la morfología típica epitelial que mostraron las células en cultivo, éstas deben manifestar la expresión genética de las citoqueratinas propias del epitelio estratificado. Esto puede verificarse mediante alguna técnica de tinción inmunohistoquímica que permita demostrar los antígenos, utilizando anticuerpos monoclonales como el AE1 que permite identificar las citoqueratinas K10, K14, K15, K16 y K19 y el AE3 que identifica las 8 citoqueratinas básicas (K1-K8), entre las cuales se encuentran las queratinas principales características del epitelio estratificado de la epidermis.

7. CONCLUSIONES

- El proceso de estandarización de la técnica de cultivo de queratinocitos demostró que la viabilidad de las células obtenidas a partir de una muestra de tejido no es afectada por el método de digestión del tejido en dispasa.
- Se requiere una mayor densidad celular para el cultivo de queratinocitos, que para otros tipos celulares, ya que no todos los queratinocitos son nucleados. Las colonias de queratinocitos de mayor edad presentan focos de diferenciación terminal, en donde las células ya estratificadas pierden la adhesividad con el sustrato de cultivo.
- La selectividad del medio de cultivo utilizado, permitió suprimir la proliferación de fibroblastos y melanocitos, tipos celulares contaminantes; y la obtención de monocapas de queratinocitos confluentes a los 12-14 días de cultivo.
- Las TC de los cultivos analizados fluctuó entre 0.2 y 0.73 mm/día y la EFC entre 0.18 y 0.28%. Ambos parámetros coinciden con los valores reportados por otros autores para cultivos primarios de queratinocitos.
- El crecimiento de queratinocitos primarios y de primer pase sobre submucosa intestinal porcina se mostró restringido por las hendiduras e irregularidades del material por lo cual, los cultivos sobre SIS en experimentos posteriores requerirán de otro método diferente a la medición de colonias para estimar el crecimiento celular, así como del uso de células subcultivadas un mayor número de veces, para aumentar la capacidad de proliferación sobre el biomaterial.
- El estado actual de esta investigación confirma la factibilidad de un modelo de sustituto epidérmico basado en el cultivo de queratinocitos humanos sobre

submucosa intestinal porcina. Los ensayos a futuro deben apuntar hacia la optimización de la técnica de cultivo sobre SIS para conseguir una adhesión y tasa de crecimiento suficientes para alcanzar la confluencia.

GLOSARIO

A: años.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

ASB: albúmina sérica bovina.

Ca²⁺: catión de calcio bivalente.

EFC: eficiencia formadora de colonias.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EPB: extracto de pituitaria bovino.

Fd: factor de dilución.

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.

GAG: glicosaminoglicano.

GP: glicoproteína.

h: horas.

L: litros.

MEC: matriz extracelular.

MEM: medio mínimo esencial de Eagle.

min: minutos.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

nm: nanómetros.

PBS: solución buffer fosfato sin calcio ni magnesio.

PG: proteoglicano.

rEGF: EGF recombinante.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

SBF: suero bovino fetal.

SFM: medio libre de suero para queratinocitos.

SIS: small intestinal submucosa.

TC: tasa de crecimiento celular.

TGF: factor de crecimiento transformador

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

3D: tridimensional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bello YM, Falabella Af, Eaglstein WH. **Tissue Engineered Skin: Current Status in Wound Healing.** Am J Clin Dermatol 2001;2(5):305-313.
2. Olivares J, Delbouis A, Fernández J, Escalante J. **Tratamiento de heridas con ulceración crónica, mediante submucosa de intestino delgado.** Rev Mex Ortop Traum 2002;16(3):may-jun:125-130.
3. Tabima D., **Desarrollo de una metodología para la preparación y evaluación de matrices biodegradables usadas para el crecimiento de fibroblastos,** Tesis de Maestría en Ingeniería Mecánica, Universidad de los Andes, 2003.
4. Badylak S, Lian g A, Record R, Tullius R, Hodde J. **Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold.** Biomaterials 1999;20:2257-2263.
5. Lindberg K. Badylak S. **Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins.** Burns 2001; 27:254-266.
6. SIS Technology: **Small Intestinal Submucosa, A naturally occurring, extracellular matrix.** Brochure COOK Biotech Incorporated, www.cooksurgical.com.
7. Genneser. **Piel.** Histología, editorial Panamericana, cap 17, 2000.
8. Ebling F., Eady R. **Anatomy and organization of human skin.** Dermatology encyclopaedia, cap 3, 1997.
9. Parenteau N., Hardin J. **Skin.** Principles of tissue engineering. Editorial Academic press, cap 62, 2000.
10. Bronzino J. **Biomedical engineering handbook.** Cap 105-109, 1992.
11. J. Rheinwald, H. Green. **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.** Cell 6. 331-343.

12. Falke GF, Atala A. **Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular.** Arch.argent.pediatr 2000;98(2):103.
13. Tezcaner A, Kose G, Hasmer V. **Fundamentals of Tissue Engineering: Tissues and applications.** Technology and Health Care 2002; 10:203.
14. <http://www.diariomedico.com/medicina/med150199combis.html>
15. Vacanti J. **Tissue engineering.** Arch Surg 1999; 134.
16. Schmidt CE, Baier JM. **Acellular vascular tissues:natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering.** Biomaterials 2000;21:2215-2231.
17. Suckow MA, Voytik-Harbin SL, Terril LA, Badylak SF. **Enhanced Bone Regeneration Using Porcine Small Intestinal Submucosa.** Journal of Investigative Surgery 1999;12:277-287.
18. **Serum free medium catalogue.** Gibco Invitrogen, junio, 2001.
19. Freshney I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic technique.** Fourth edition, 2000.
20. O'Connor VV, Uhlemann H y Tilgen W. **Análisis de los medios de transporte y cultivo de piel para auto o aloinjerto humano.** Soft and hard tissue repair 1999 3 (3): 1-28.
21. Judd DA, Batista PJ, Dehm DD. **Culture of human keratinocytes in defined serum free medium.** Focus, 1997 19 (1):1-4.
22. Serum-free media for cell culture, compiled by Focus on Alternatives, 2003.
23. Barrandon Y., Grenn H. **Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies.** Cell, 1987; 50:1131-1137.
24. Calderón Valle Willy. **Cultivo de queratinocitos humanos en monocapa.** Revista Boliviana de Dermatología. No. 1, 2000.
25. Anderson DM, Stanley MA, White RA. **Canine keratinocyte culture and use of a cultured epidermal autograft in a dog.** Vet Comp Orthop Traumatol 2003 4:255-260.

26. García E, Bejar J.M, Varona A, García M.D, Gabilondo F.J,. **Study of the human keratinocyte isolation methods and in vitro culture techniques in a single laboratory.** Eur J Plast Surg 1998; 21 :323-327.
27. Hawley P., Sullivan J., Kung M., Hwnnings H., Yuspa S. **Optimized Conditions for the Growth of Human Epidermal Cells in Culture.** J Invest Derm, 1980, 75:176-182.
28. [www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/medicine/MTT assay .htm](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/medicine/MTT%20assay.htm)

ANEXO A. Carta de aprobación para el uso de tejidos - Clínica Colsubsidio.

3 de mayo 2004

Doctora
M. T. AMPARO BUENDIA HERNANDEZ
Jefe de la Oficina de Investigación y Docencia
Clínica Infantil Colsubsidio
Ciudad

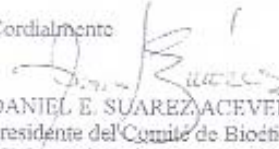
Respetado Doctora:

El Comité de Bioética de la Institución ha decidido dar el aval solicitado para la utilización de tejidos sobrantes de los procedimientos de circuncisión requeridos por la Dra. ANGELA XIMENA AMORTEGUI K. Estudiante de magister en ciencias biomédicas de la Universidad de los Andes, destinados para ser usados en su proyecto de tesis "OBTENCIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE QUERATINOCITOS HUMANOS SEMBRADOS EN SOPORTES DE SUBMUCOSA INTESTINAL PORCINA".

Este aval se ha dado haciendo énfasis en las siguientes consideraciones:

- Las muestras de tejido serán utilizadas exclusivamente para el desarrollo de una metodología para el aislamiento de los queratinocitos, y su cultivo.
- No existen finalidades de tipo económico de ninguna índole y la Universidad de los Andes se responsabiliza del buen uso científico que se le dará a estas muestras de tejido biológico, por tal razón ni la institución, ni los pacientes donantes recibirán retribución de tipo económica por la utilización del tejido.
- Los tejidos no serán objeto de comercio o trasplante, ni de manipulaciones indebidas como la clonación humana con fines reproductivos, la modificación artificial de las células humanas o cualquier otro fin diferente al ya mencionado.
- Los remanentes no utilizados de las muestras serán desechados mediante protocolos estandarizados para tales fines, igualmente se hará con los cultivos obtenidos durante el estudio cuando finalice el proyecto de investigación.
- Las prácticas de toma, transporte y manipulación de las muestras se realizarán dentro del estricto cumplimiento de normas de bioseguridad.
- Únicamente se utilizarán muestras de donantes cuyos padres o tutores hayan sido informados debidamente y hayan dado la respectiva aprobación a través del formato de consentimiento informado.
- La Clínica Colsubsidio recibirá los créditos correspondientes en todas las comunicaciones y publicaciones de carácter científico que se hagan sobre los resultados del trabajo.
- Dependiendo de los resultados de este proyecto, si llegaran a plantearse nuevas fases en esta línea de investigación, deben evaluarse nuevamente sus implicaciones científicas, clínicas, económicas y éticas.
- La investigadora se compromete a reportar a este comité los resultados de su investigación para el correspondiente seguimiento.

Cordialmente


DANIEL E. SUAREZ ACEVEDO
Presidente del Comité de Bioética
Clínica Colsubsidio

CC: Angela Ximena Amortegui R. Estudiante de Magister en Ciencias Biomédicas,
Universidad de los Andes
Dr. Eduardo Llinas, Jefe de Clínicas Quirúrgicas, Clínica Infantil Colsubsidio

ANEXO B. Consideraciones logísticas y bioéticas para el uso de los tejidos.

Las muestras de tejido serán utilizadas exclusivamente para desarrollar una metodología para el aislamiento de los queratinocitos y la obtención de un cultivo primario de estas células, utilizando matrices de submucosa intestinal porcina para su acondicionamiento.

El objetivo de este trabajo de investigación se limita a un estudio básico de experimentación y no incluye nada diferente a la determinación de un protocolo que permita cultivar las células correctamente. Por lo cual, no existen finalidades de tipo económico de ninguna índole y las Universidades del Rosario y de los Andes se responsabilizan del buen uso científico que se le dará a estas muestras de tejido biológico.

Los tejidos no serán objeto de comercio o trasplante, ni de manipulaciones indebidas como la clonación humana con fines reproductivos, la modificación artificial de las células humanas, o cualquier otro fin diferente al mencionado.

Para este trabajo de investigación no existen tampoco intereses de aplicación clínica y dadas sus condiciones no se puede plantear ningún tipo de retribución económica ni para el donante ni para la Institución, puesto que no se pretende hacer uso comercial de las muestras que solamente estarán sujetas a un tratamiento para obtener sus constituyentes celulares y establecer una técnica para su expansión.

Se aclara que los remanentes no utilizados de estas muestras serán descartados mediante el protocolo de desechos correspondiente y propio del laboratorio, en cuyas instalaciones se llevará a cabo el experimento. Una vez culmine la investigación y se hayan determinado los resultados y conclusiones del caso, los cultivos celulares obtenidos que se hayan mantenido hasta ese entonces, serán desechados mediante estos mismos protocolos, puesto que no es de interés perpetuar las células que de cualquier modo constituyen una línea celular finita ya que solo resisten un número de pases limitado en cultivo.

Las prácticas de experimentación realizadas con las muestras de tejido se llevarán a cabo bajo las normas de bioseguridad pertinentes, desde su adquisición en la sala de cirugía, hasta su eliminación como material de desecho en el laboratorio. Esto garantiza el nivel de protección adecuado tanto para el investigador como para el medio ambiente con el fin de evitar posibles riesgos de contagio en el caso de que las muestras estuvieran alteradas patológicamente o infectadas con algún factor de carácter transmisible.

Únicamente se utilizarán muestras de donantes cuyos padres o tutores hayan sido informados debidamente del propósito, y hayan dado la respectiva aprobación a través del formato de consentimiento informado.

La Clínica Colsubsidio recibirá los créditos correspondientes en todas las comunicaciones y publicaciones de carácter científico que se hagan sobre los resultados del trabajo propuesto, que estará basado en el material cedido por la Institución colaboradora, haciendo siempre mención de la procedencia de las muestras.

Teniendo en cuenta que la justificación de esta investigación está basada en el establecimiento de métodos que contribuyan al progreso de la ciencia en el campo de los sustitutos de piel, también es importante aclarar que dependiendo de los resultados obtenidos al finalizar este proyecto, es posible que puedan desarrollarse otros trabajos más adelante que sigan esta misma línea de investigación, para los cuales sería necesario plantear en su debido momento las nuevas implicaciones científicas, clínicas y según el caso económicas dentro del marco de los objetivos de éstos y si fuera el caso de que la Clínica Colsubsidio estuviera interesada en seguir participando en los procesos de investigación de la Maestría en Ciencias Biomédicas, programa conjunto de las Universidades de los Andes y del Rosario de Bogotá.

ANEXO C. Formato de consentimiento informado.



MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACIÓN DE TEJIDOS INFANTILES DE CIRCUNCISIÓN CON FINES DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

EDAD DEL PACIENTE : _____ **H.C.Nº** _____

PRIMERO - Nosotros _____ identificamos como aparece al pie de la firma, por medio del presente documento, obrando en calidad de padres / tutores del donante formal de tejido sobrante del procedimiento de circuncisión y en pleno uso de nuestras facultades mentales; otorgamos en forma libre nuestro consentimiento y autorizamos desde ahora a la **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** y a la **UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**, para que por medio de sus grupos de investigación y con la participación correspondiente de los Médicos y demás profesionales de la salud que se requieran de la **IPS COLSUBSIDIO**, hagan uso del tejido en mención extraído durante la cirugía para efectos de la investigación biomédica propuesta a continuación.

SEGUNDO - Este tejido indicado será utilizado únicamente para el desarrollo de técnicas de cultivo celular, con el fin de establecer métodos que contribuyan al progreso de la ciencia en el campo de los sustitutos de piel; aclarando que este tejido no será objeto de comercio o trasplante, de manipulaciones indebidas como la clonación humana con fines reproductivos, de modificación artificial de las células humanas, ni de cualquier otro fin diferente al mencionado; y que tampoco recibimos retribución o remuneración económica respecto a la donación del tejido o a la utilización de los elementos celulares que lo constituyen conforme lo reglamenta el decreto 1546 de 1998 en su artículo 7.

TERCERO - A través de la cesión de los residuos quirúrgicos que constituyen un material esencial de investigación, las Universidades mencionadas quedan autorizadas para llevar a cabo los estudios propuestos con las muestras biológicas, responsabilizándose de su buen uso científico, su eliminación una vez culminada la experimentación, y sin finalidades económicas de ninguna índole.

CUARTO - Hemos realizado las preguntas sobre el tema y hemos recibido claras instrucciones en el sentido que el consentimiento que otorgamos mediante este documento, puede ser revocado o dejado sin efecto por nuestra decisión formal.

Padres / Tutores:

Firma: _____	Firma: _____
Nombre: _____	Nombre: _____
Cédula: _____	Cédula: _____

Testigo 1:

Firma: _____
 Nombre: _____
 Cédula: _____ Teléfono: _____

Testigo 2:

Firma: _____
 Nombre: _____
 Cédula: _____ Teléfono: _____

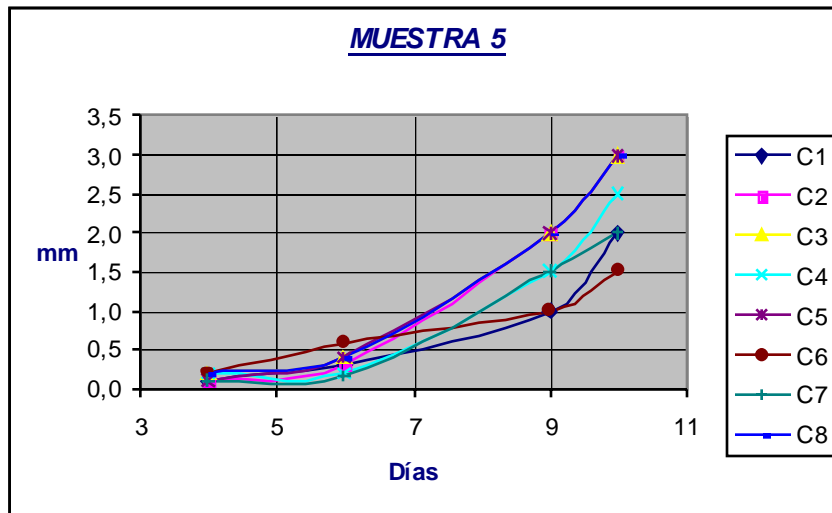
Certifico que he explicado la naturaleza, propósito y ventajas de la utilización del tejido residual quirúrgico de los procedimientos de circuncisión, y he contestado todas las preguntas. Considero que los padres / tutores, comprenden completamente lo que he explicado.

_____	_____
Fecha	Firma Médico

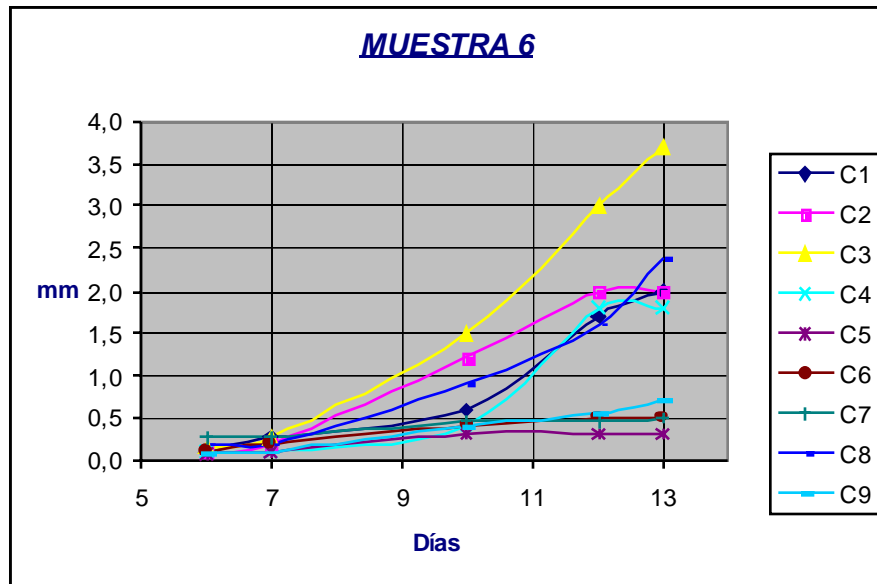
Para mayor información, comunicarse con Alberto Vélez, Presidente Comité de Ética, U. del Rosario (3474570 ext. 236 o 300-2079804); y/o Angela Amórtegui, investigadora principal del proyecto (2250847 ó 310-6895487).

ANEXO D. Cálculos de TC, EFC y curvas de crecimiento.

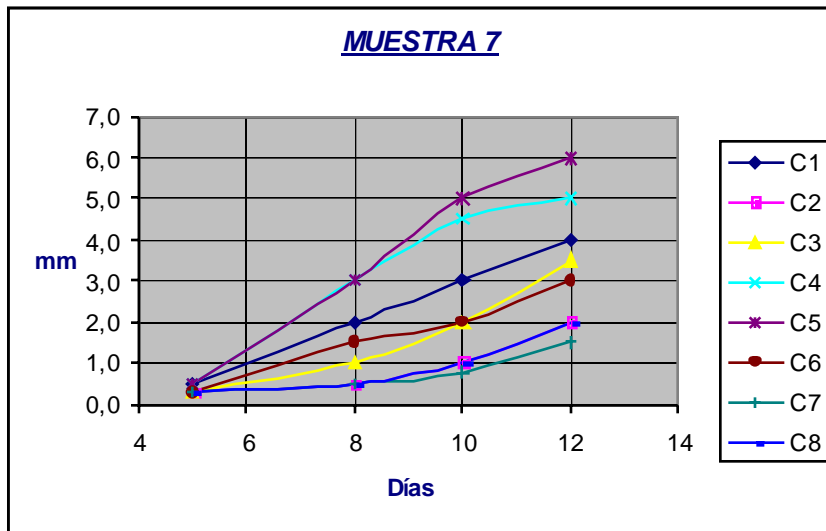
MUESTRA 5					
Células = 1,5E+06			Área= 9.1 cm ²		
Colonias	Días de cultivo				TC (mm/día)
	4	6	9	10	
C1	0,1	0,3	1,0	2,0	0,38
C2	0,1	0,3	2,0	3,0	0,58
C3	0,2	0,4	2,0	3,0	0,56
C4	0,2	0,2	1,5	2,5	0,46
C5	0,1	0,4	2,0	3,0	0,58
C6	0,2	0,6	1,0	1,5	0,26
C7	0,1	0,2	1,5	2,0	0,38
C8	0,2	0,4	2,0	3,0	0,56
TC promedio					0,47
Colonias / cm ²					300
EFC					0,18



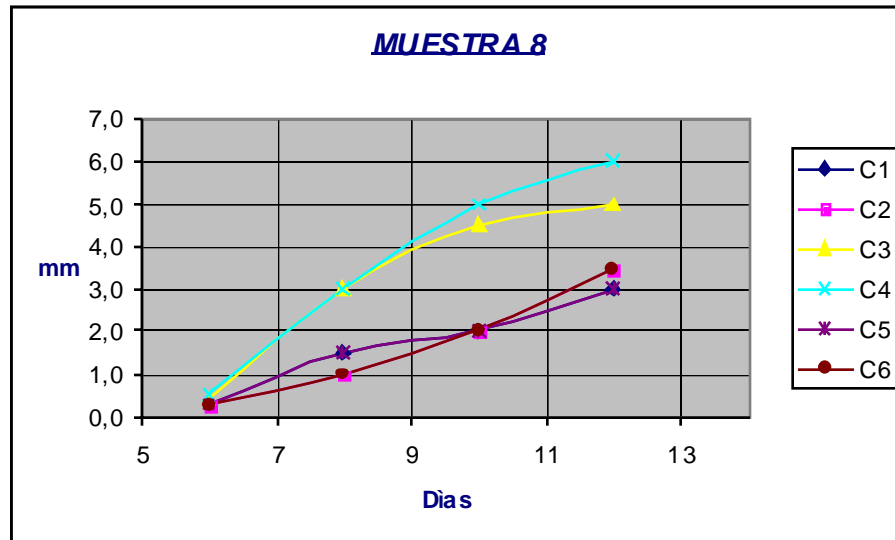
MUESTRA 6						
Células = 1,2E+06			Área= 9.1 cm ²			
Colonias	Días de cultivo					TC (mm/día)
	6	7	10	12	13	
C1	0,1	0,3	0,6	1,7	2,0	0,27
C2	0,1	0,2	1,2	2,0	2,0	0,27
C3	0,2	0,3	1,5	3,0	3,7	0,51
C4	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,24
C5	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,03
C6	0,1	0,2	0,4	0,5	0,5	0,06
C7	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,04
C8	0,2	0,2	0,9	1,6	2,4	0,31
C9	0,1	0,1	0,4	0,6	0,7	0,09
TC promedio						0,20
Colonias / cm ²						250
EFC						0,19



MUESTRA 7					
Células =		1,3E+06		Área de cultivo = 9.1 cm ²	
Colonias	Días de cultivo				TC (mm/día)
	5	8	10	12	
C1	0,5	2,0	3,0	4,0	0,7
C2	0,3	0,5	1,0	2,0	0,34
C3	0,3	1,0	2,0	3,5	0,64
C4	0,5	3,0	4,5	5,0	0,9
C5	0,5	3,0	5,0	6,0	1,1
C6	0,3	1,5	2,0	3,0	0,54
C7	0,3	0,5	0,8	1,5	0,24
C8	0,3	0,5	1,0	2,0	0,34
TC promedio					0,60
Colonias / cm ²					400
EFC					0,28



MUESTRA 8					
Células = 1,6E+06			Área de cultivo = 9.1 cm ²		
Colonias	Días de cultivo				TC (mm/día)
	6	8	10	12	
C2	0,3	1,5	2,0	3,0	0,54
C3	0,3	1,0	2,0	3,5	0,64
C4	0,4	3,0	4,5	5,0	0,92
C5	0,5	3,0	5,0	6,0	1,1
C6	0,3	1,5	2,0	3,0	0,54
C7	0,3	1,0	2,0	3,5	0,64
TC promedio					0,73
Colonias / cm ²					400
EFC					0,23



MUESTRA 10				
Células =		1,6E+06		Área = 9.1 cm ²
Colonias	Días de cultivo			TC (mm/día)
	5	7	9	
C1	0,5	1,0	2,0	0,75
C2	0,5	1,0	2,5	1
C3	0,3	0,5	1,0	0,35
C4	0,3	0,5	0,8	0,25
C5	1,0	1,3	2,0	0,5
TC promedio				0,57
Colonias / cm ²				360
EFC				0,20

